Schweizerisches Tropeninstitut, Basel, und
Zoologische Anstalt der Universität Basel

Zur Histochemie und Histologie des Mitteldarmes von *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* in Zusammenhang mit der Blutverdauung

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Eugen Gander
aus Basel/BS

1967

Basel 1968

Verlag für Recht und Gesellschaft AG., Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. R. GEIGY, Dr. A. PORTMANN und Privatdozent Dr. C. G. HONEGGER.

Basel, den 28. November 1967.

Prof. Dr. H. HUBER.

Separatdruck aus Acta Tropica Bd. XXV, Heft 2, 1968

Liliane
und
meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0072

Inhaltsverzeichnis

I. *Einleitung und Fragestellung* 134

II. *Material und Methoden* 136
1. Tiermaterial 136
2. Methoden 136
a) Untersuchungen zur Bestimmung der chemischen Natur der Klistiermembranen 136
b) Die Herstellung von Kryostatschnitten 137
c) Histochemische Färbungen 138
d) Lösungsmittelversuch an nach Blutmahlzeiten gebildeten Membranen von *Anopheles stephensi* 139

III. *Resultate* 139
1. Zur chemischen Natur der Klistiermembranen 139
2. Histochemische und histologische Befunde 140
a) Histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten und Lipiden bei Klistiermembranen 141
b) Histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten und Lipiden bei Membranen, die nach einer Blutmahlzeit gebildet wurden 141
c) Die nachgewiesenen Stoffe während der Blutverdauung . . 143
3. Ergebnisse weiterer Versuche 158
a) Vorversuche am Kryostaten 158
b) Das Verhalten der peritrophischen Membran (PM) von *Anopheles stephensi* in einem unpolaren Lösungsmittel 158
4. Zusammenfassung der Resultate 159

IV. *Diskussion der Resultate* 161
1. Diskussion der Methoden 161
2. Die Sekretionsmechanismen und die Entstehung der PM . . . 163
3. Die chemische Natur der PM 165
4. Der Ablauf der Blutverdauung 166
5. Die Bedeutung der PM im Rahmen der Verdauung 171

V. *Literaturverzeichnis* 172
Résumé 174
Summary 175

I. Einleitung und Fragestellung

Die morphologischen und physiologischen Aspekte der Blutverdauung verschiedener, malariaübertragender und anderer Stechmückenarten bilden die unmittelbaren Grundlagen der vorliegenden Arbeit.

Es ist bekannt, daß bei den meisten Insektenarten der Mageninhalt nicht unmittelbar dem Epithel anliegt, sondern von diesem durch eine lamellige Struktur, der peritrophischen Membran, im folgenden «PM» genannt, getrennt ist.

STOHLER (31) zeigt, daß neben den zwei von WIGGLESWORTH (34) beschriebenen Bildungsmodi der PM bei den verschiedensten Insektenfamilien — Ausscheidung und periodische Delamination aus den Epithelzellen des Mitteldarmes und Abgabe einer viskösen Vorstufe der PM aus Zellgruppen des Proventrikels — bei *Aedes aegypti* eine dritte Entstehungsmöglichkeit verwirklicht ist. Die Epithelzellen des magenartigen, hinteren Mitteldarmabschnitts sezernieren dabei anläßlich der Blutaufnahme ein viskäses Material, das später zur PM erhärtet.

WATERHOUSE (32) weist als erster den chitinösen Charakter der PM von *Aedes aegypti* mit Van Wisselinghs Chitosan-Jod-Test nach.

FREYVOGEL et al. (11, 12, 13) beschreiben die PM-Bildung bei verschiedenen Culcidenarten. Dabei bestätigt sich der Befund WIGGLESWORTHs (34) über die Entstehung der PM bei *Aedes aegypti* aus Sekretionsmaterial der Epithelzellen. Die Culicidenart *Anopheles maculipennis atroparvus* scheint eine Ausnahme zu bilden; bei ihr werden keine PM-Bildungen gefunden.

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß Membranbildungen bei *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* allein schon durch mechanische Dehnung des Darmepithels mittels Luft- oder physiologischer NaCl-Klistieren hervorgerufen werden können. Die PM wird nach Klistierapplikation schneller gebildet (bei *Aedes aegypti* 2—6 Stunden, bei *Anopheles stephensi* 15—20 Stunden nach Verabreichung des Klistiers) als dies nach der oralen Aufnahme der Blutmahlzeit der Fall ist (bei *Aedes aegypti* 18—24 Stunden, bei *Anopheles stephensi* 28—36 Stunden nach der Blutaufnahme). Der Van Wisselingh-Test zeigt an Klistiermembranen ebenfalls eine positive Reaktion, was auf die Anwesenheit von Chitin sowohl in den Membranen von *Aedes aegypti* als auch in denen von *Anopheles stephensi* deutet. Die Autoren (12) weisen aber auf die fragwürdige Spezifität des Van Wisselingh-Tests hin, da die von *Anopheles stephensi* gebildete Membran wasserlöslich ist, ein sehr ungewönlicher Befund für Chitin.

Die zytologischen Veränderungen, welche im Verlaufe einer Blutmahlzeit auftreten, und deren Zusammenhang mit der PM-Bildung untersuchen FREYVOGEL & STAEUBLI (13) einerseits anhand azangefärbter Paraffinschnitte und elektronenmikroskopischer Präparate und anderseits an Sektionen lebendfrischer, blutgefüllter Mitteldärme zu verschiedenen Zeiten nach der Blutaufnahme. In einer weiteren Arbeit (30) werden die Unterschiede zwischen den Epithelzellen von *Aedes aegypti* und denen von *Anopheles stephensi,* wie sie sich in licht- und elektronenmikroskopischen Präparaten zeigen, beschrieben. Lichtmikroskopisch können in den basalen Teilen der Epithelzellen ungefütterter *Aedes*-Weibchen eine nach Azanfärbung orange erscheinende Granulation und in den Epithelzellen ungefütterter *Anopheles*-Weibchen «Vakuolen», die sowohl apical als auch basal zu finden sind, beobachtet werden. Beide Strukturen können unmittelbar nach dem Saugakt nicht mehr gezeigt werden. Dafür wird zwischen Darmwand und Blutfüllung ein «blauer Saum» sichtbar, von dem die Autoren annehmen, daß er aus der Granula respective den «Vakuolen» entstanden ist. Im elektronenoptischen Bild können diese Strukturen weiter differenziert werden. Sie dürften bei *Aedes aegypti* den «hochorganisierten, ribo-

somen-besetzten Komplexen des endoplasmatischen Reticulums», welche im angelsächsischen Sprachbereich als «whorls» bezeichnet werden, und bei *Anopheles stephensi* der «Zymogengranula» entsprechen. Auch diese lassen sich nämlich nach der Blutaufnahme nicht mehr nachweisen. Histochemisch verhalten sich die «whorls» bei *Aedes aegypti* wie Ribonucleinsäure.

Neben diesen morphologischen und histologischen Arbeiten sind die Untersuchungen Fisks und Shambauchs (8, 9) sowie Goodings (17), welche *in vitro* die Proteaseaktivität in homogenisierten Mitteldärmen von *Aedes aegypti*-Weibchen untersuchten, für unsere Fragestellung von Interesse. Danach ist ein stetiges Ansteigen der Proteaseaktivität, die 24 Stunden nach dem Saugakt ein Maximum erreicht und anschließend bis zum Ende der Blutverdauung nach 48 Stunden gleichmäßig auf den Ausgangswert der ungefütterten Mücke absinkt, charakteristisch.

Über die Rolle, die der PM im Rahmen des Verdauungsablaufs zukommt, herrscht Unklarheit. Stohler (31) erwähnt, daß die PM die Mitteldarmzellen vor Beschädigung durch harte oder scharfe Nahrungsbestandteile schützen könnte, weist aber bereits darauf hin, daß diese Funktion für blut- oder nektarsaugende Insekten nicht zutreffen kann. Er erwähnt, daß verschiedene Experimente die Vermutung zulassen, daß die Membran als Ultrafilter wirken könnte. Freyvogel & Staeubli (13) erwägen eine mechanische Aufgabe, nämlich das Verhindern des Ausfließens des Darminhalts.

Das Ziel dieser Studie war, neue Einblicke in das Problem der Blutverdauung bei Stechmücken zu gewinnen. Ausgehend von den diskutierten Arbeiten schien es sinnvoll zu prüfen, ob zwischen *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* außer den von Freyvogel et al. (12, 13, 30) beschriebenen Unterschieden in den Epithelzellen und der PM auch Abweichungen in der Art der Blutverdauung bestehen, und ob eventuell eine Korrelation zwischen Bildung der PM und Verdauungszustand des Darminhalts besteht. Im Vordergrund stand sodann die Bestimmung der chemischen Natur der PM. Dabei verwendeten wir an Stelle von Paraffinschnitten Kryostatschnitte. Diese Methode verringert die Möglichkeit von Artefaktbildungen während der Fixierung und der anschließenden Paraffineinbettung, da diese der Schnittherstellung vorausgehenden Prozeduren vermieden werden, was wiederum die Durchführung und Auswertung histochemischer Reaktionen erleichtert und zum Teil erst ermöglicht.

Die von Freyvogel & Jaquet (12) beschriebene Auslösung der Sekretionsvorgänge und Membranbildung durch mechanisches Dehnen der Darmepithelzellen mittels luft- oder physiologischer NaCl-Klistieren ist eine ideale Methode zur Darstellung einer «Modellmembran». Für chemische Analysen wählten wir solches Membranmaterial, künftig «Klistiermembranen» genannt, da nicht befürchtet werden mußte, daß Ergebnisse durch Blutrückstände verfälscht oder verändert würden.

Auf Grund zahlreicher Arbeiten über den chemischen Aufbau der PM der verschiedensten Insektenfamilien (4, 5, 12, 15, 16, 18, 21, 23, 27, 31, 32, 33, 34) und der Tatsache, daß die peritrophische Zone der untersuchten Insektenspecies nach Azanfärbung blau erscheint (13), eine Reaktion, die auf Anwesenheit von Mucinen hindeutet, suchten wir in erster Linie nach spezifischeren Nachweisreaktionen auf diese Stoffgruppe, die nach Meyer (22) alle Mucopolysaccharide umfaßt. Da nach den Kenntnissen über den chemischen Aufbau von tierischen Membranen diese meist aus Lipoproteinen bestehen, stellten wir uns die Frage, ob eventuell an der Bildung der PM noch Lipide beteiligt seien.

An dieser Stelle möchte ich meinen verehrten Lehrern, den Herren Professoren Dr. R. Geigy und Dr. T. A. Freyvogel, für ihr stetes Interesse, ihre wert-

vollen Anregungen zu dieser Dissertation und für den Arbeitsplatz am Schweizerischen Tropeninstitut meinen herzlichsten Dank aussprechen. Für Anregungen und Diskussionen verschiedener biochemischer Aspekte, welche sich aus dieser Arbeit ergaben, bin ich Herrn PD Dr. C. G. Honegger von der Neurologischen Klinik der Universität Basel zu größtem Dank verpflichtet. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Schweizerischen Tropeninstituts, die mir während der Dauer meiner Untersuchungen in irgendeiner Art behilflich waren.

II. Material und Methoden

1. Tiermaterial

Unsere Untersuchungen führten wir an Stechmückenweibchen der Arten *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* aus den Zuchten des Schweizerischen Tropeninstituts durch. Zur Kennzeichnung der *Aedes-* und *Anopheles*-Stämme verwenden wir künftig die Abkürzungen «Ae.» und «An.».

Der *Ae. aegypti*-Stamm geht zurück auf Eier, welche Professor Dr. R. Geigy 1945 aus dem damaligen Belgischen Kongo nach Basel brachte. Die *An. stephensi*-Mücken stammen aus dem Hamburger Tropeninstitut. Angaben über die Zuchtmethoden der von uns verwendeten Mückenarten finden sich bei Geigy & Herbig (15) und Gander (14).

Die Mücken wurden ausschließlich auf Meerschweinchen gefüttert. Wie Freyvogel (13) zeigte, wird der Ablauf der Blutverdauung und die PM-Bildung von der Art der Wirtblutes nicht beeinflußt. Es darf daher angenommen werden, daß sich unsere Ergebnisse auch nach Blutmahlzeiten an anderen Wirten (z. B. Mensch, Huhn, Ratte, Maus, etc.) reproduzieren lassen.

Zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Blutmahlzeit wurde zwischen 1 und 36 Stunden nach dem Saugakt für jede histochemische Reaktion und Mückenart in einstündigen Abständen je ein Mitteldarm längsgeschnitten und untersucht. Von 36 Stunden bis zum Ende der Blutverdauung vergrößerten wir diese Intervalle auf durchschnittlich 4 Stunden. Der zeitliche Ablauf der Blutverdauung unterliegt bei den einzelnen Mückenindividuen einer breiten biologischen Streuung, so daß erst die Auswertung einer möglichst großen Anzahl von Präparaten eine repräsentative Aussage über den tatsächlichen zeitlichen Verlauf der Abbauvorgänge im Darmlumen ermöglicht.

2. Methoden

a) Untersuchungen zur Bestimmung der chemischen Natur der Klistiermembranen

Die Klistiermembranen wurden nach der von Freyvogel & Jaquet (12) beschriebenen Methode gewonnen. Ungefütterten Mückenweibchen wird dazu unter leichter Äthernarkose eine fein ausgezogene Pipette in das Rectum eingeführt. Diese dient als Spitze einer Mikrometerspritze, mit welcher physiol. NaCl in den Darmtrakt injiziert wird. Sobald das Abdomen auf eine Dimension, wie sie der oralen Aufnahme einer Blutmahlzeit entspricht, gedehnt ist, wird die Mücke von der Pipette abgestreift. Die Klistiermembranen können bei *Ae. aegypti* zwischen 4 und 6 Stunden, bei *An. stephensi* zwischen 15 und 20 Stunden nach Applikation der Klistiere aus dem Abdomen herauspräpariert werden.

Kohlenhydrate

Je 10 Klistiermembranen wurden auf Whatman-I-Papier aufgetragen und auf Kohlenhydrate geprüft. Als Nachweisreagenz für diese Stoffklasse verwendeten wir Anisaldehydschwefelsäure nach STAHL (29). Eine positive Reaktion erfolgt allerdings auch in Anwesenheit von Steroiden und Terpenen. Um diese Nebenreaktion auszuschalten, wurde das Papier in eine kleine Nutsche gelegt und die Steroide und Terpene durch 10minütiges Durchsaugen eines Gemisches von Methanol und Chloroform im Verhältnis 1:2 extrahiert. Anschließend erfolgte der Nachweis durch Besprühen des Papiers mit Anisaldehydschwefelsäure und Erhitzen auf 90° C während 5—10 Minuten.

Lipide

Wiederum wurden zum Nachweis dieser Verbindungsklasse 10 Klistiermembranen verwendet. Als Nachweisreagenz verwendeten wir Phosphormolybdänsäure (29). Die Membranen wurden auf mit Kieselgel G beschichtete Dünnschichtplatten aufpipettiert, um die empfindliche Schicht nicht durch Glasnadeln oder Pinzetten zu zerstören. Die Platten besprühten wir mit dem Reagenz und erhitzten auf 100° C während 5 Minuten.

Die Weiterdifferenzierung des Lipidanteils der Klistiermembranen erfolgt auf dünnschichtchromatographischem Weg. 10 Membranen pro Mückenart wurden nach der beschriebenen Methode auf Kieselgel-G-Platten aufgetragen, bei Kammersättigung in Chloroform aufgetrennt und mit Phosphormolybdänsäure angefärbt. Die gelbliche Hintergrundfärbung der Platten wurde mit NH_3-Dämpfen entfernt. Parallel dazu wurde eine Testlösung aufgetragen (vgl. Abb. 1).

Proteine

Zu ihrem Nachweis wandten wir die Kupfer-Folin-Reaktion an, wie sie in der Klinik zur Bestimmung des Liquorproteins angewendet wird. Der Ablauf dieser Reaktion läßt sich nach RIEDER (25) vereinfacht so darstellen:

$$\text{Stufe I: } CuSO_4 + \text{Protein} \rightarrow \text{Kupfer-Protein-Komplex}$$

$$\text{Stufe II: Phosphormolybdänsäure} \xrightarrow[\text{Cu-Prot. Kompl.}]{\text{Reduktion}} \text{Molybdänblau}$$

Um eventuell unlösliche Proteine zu erfassen, wurden die Klistiermembranen mit Trypsin angedaut. Je 10 Membranen wurden während 3 Stunden in 5 ml einer 1%igen Trypsinlösung von 37° C bei einem pH von 8,2 eingelegt. Der pH-Wert wurde in Abständen von einer halben Stunde mit Natriumtetraborat frisch eingestellt. Die Lösung wurde während einer halben Stunde im Wasserbad bei 68° C inaktiviert. Anschließend wurde die Kupfer-Folin-Reaktion durchgeführt.

Parallel zu jedem Versuch wurde eine Blindprobe ohne Membranen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte photospektrometrisch durch Bestimmen der Extinktion bei 750 nm gegen den Wert der Blindprobe.

b) Die Herstellung von Kryostatschnitten

Wie einleitend erwähnt, wurden alle histologischen und histochemischen Reaktionen ausschließlich an Kryostatschnitten durchgeführt.

Zu deren Herstellung verfuhren wir folgendermaßen: Es wurden Mückendärme in physiologischer NaCl-Lösung aus dem Abdomen herauspräpariert und in Mäuseleberstückchen von 3—5 mm Kantenlänge eingebettet. Diese wurden während 10 Sekunden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mit CO_2 und Wasser auf

Gefriertischchen befestigt und im Kryostaten 7 oder 10 μ dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und durch Erwärmen der Objektträgerunterseite mittels eines Fingers dort angeklebt.

Anschließend wurden die Schnitte gemäß einer der nachstehend besprochenen Methoden fixiert und gefärbt (vgl. Abschnitt c).

Um die Orientierung in den Präparaten zu erleichtern, wurden die Malpighischen Gefäße beim Einbetten in die Leberstückchen am Analpol des Darmes belassen. Das Einbetten der Mückendärme in Leberstückchen erleicherte einerseits das Schneiden am Kryostat und gab uns anderseits die Möglichkeit, die Ergebnisse der histochemischen Reaktionen an unserem Material durch Vergleiche mit den histochemisch gut untersuchten Leberzellen zu kontrollieren.

c) Histochemische Färbungen

PAS-Reaktion (nach PEARSE *[24])*

Auf Grund früher erschienener Arbeiten (4, 5, 12, 15, 16, 19, 21, 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34) dürfen wir von einer Gruppe kohlenhydrathaltiger Stoffe annehmen, daß sie während der Blutverdauung oder bei der Membranbildung von Wichtigkeit sein könnten. Es handelt sich dabei um Glycogen, Mucoproteide, Chitin und saure Mucopolysaccharide. Die beiden erstgenannten sind PAS-positive Stoffe, während Chitin und saure Mucopolysaccharide PAS-negativ sind (7, 20). Dank der Einbettung der Mückendärme in Mäuseleberstücke kann Glycogen durch Farbvergleiche der Reaktionsendprodukte mit den stark glycogenhaltigen Leberzellen erkannt werden. Schnitte, die der PAS-Reaktion unterworfen wurden, fixierten wir nach Lillie (24).

Chitin-Nachweis

Der Chitinnachweis nach Van Wisselingh ist für histologische Schnitte nicht geeignet, da die Behandlung mit der starken Base KOH die Zellen zerstört. Er kann jedoch zum Nachweis von Chitin an isolierten peritrophischen Membranen herangezogen werden (13).

Eine andere Färbung nach GRAY (18), welche speziell auf Arthropodenchitin spezifisch sein soll, ist der Chitintest nach Chatton. Versuchsschnitte an ganzen Mückenindividuen bestätigen dies jedoch nicht. Als Nachweisreagenz auf Chitin verwendeten wir Chitinase (Firma Calbiochem). Dieses Enzym hat ein pH-Optimum von 6,5, seine optimale Temperatur liegt bei 37° C.

Die fixierten Schnitte wurden bei dieser Temperatur während zwei Stunden einer 1%igen Lösung dieses Enzyms im Phosphat-Puffer nach Sörensen, pH: 6,5 ausgesetzt und anschließend nach PAS gefärbt. Kontrollschnitte wurden für die gleiche Dauer im gleichen Puffer, aber ohne Chitinasezusatz, inkubiert und anschließend gefärbt.

Bei der Beurteilung dieser Reaktion muß allerdings in Betracht gezogen werden, daß zwar die PM mit diesem Enzym aus den Schnittpräparaten gelöst werden konnte, daß aber auch der Blutkuchenrand zum Teil abgebaut wurde. Außerdem scheint die Chitinase die Empfindlichkeit der Zellkerne gegenüber Haematoxylin-Delafield-Färbung zu verändern (vgl. Abb. 4, 5).

Fixiert wurde auch bei dieser Reaktion in Lillies Fixierungsmittel (24).

Sudanschwarz-B-Färbung (nach PEARSE *[24])*

Die Lipide wurden mit der unspezifischen Sudanschwarz-B-Reaktion nachgewiesen.

Sudanschwarz-B ist ein Farbstoff, der in den Lipiden besser löslich ist als

in seinem eigenen Lösungsmittel. Die Löslichkeit und damit auch die Empfindlichkeit nimmt über Phospholipide, Cerebroside zu den Neutralfetten ab.

Alle Schnitte, die dieser Färbung unterworfen wurden, fixierten wir in 4%igem Formalin.

Benzidintest (nach PEARSE *[24])*

Benzidin, ein aromatisches Amin, wird in Anwesenheit von Peroxydase-Peroxyd-Systemen zu Benzidinblau oxydiert. Aus diesem Grunde verwendeten wir den Benzidintest zum Nachweis von Haemoglobin, welches nach PEARSE (24) eine Peroxydase darstellt. Bei dieser Reaktion wurde wiederum nach Lillie (24) fixiert.

Quecksilber-Bromphenolblau-Reaktion (nach PEARSE *[24])*

Hg-Bromphenolblau wird in der Histochemie als unspezifische Reagenz auf Proteine benützt. Da wir jedoch an Parallelschnitten den Benzidintest vergleichend mit der Hg-Bromphenolblau-Reaktion durchführten, ist es möglich, die Unspezifität der Hg-Bromphenolblau-Färbung einzuschränken. Lillies Fixierungsmittel ergab die besten Resultate.

Azanfärbung (nach ROMEIS *[26])*

Als Vergleichs- und Übersichtsfärbung verwendeten wir diese Methode, die in früheren Arbeiten (13, 31) zur Darstellung der PM verwendet wurde. Als Fixierungsmittel diente Carnoy'sche Lösung.

d) Lösungsmittelversuch an nach Blutmahlzeiten gebildeten Membranen von *Anopheles stephensi*

Zur Prüfung des Verhaltens der Membranen in Lösungsmitteln mit verschiedener Dielektrizitätskonstante wurden diese in eine Blockschale, die, im ersten Versuch 1—2 ml H_2O, im zweiten die gleiche Menge Chloroform enthielten, eingelegt. Das Verhalten der Membranen wurde in halbstündigen Abständen unter dem Binokular geprüft. Die Versuche wurden nach 4 Stunden abgebrochen.

III. Resultate

1. Zur chemischen Natur der Klistiermembranen

Kohlenhydrate

Bei den Klistiermembranen beider Mückenarten fällt die Anisaldehydschwefelsäure-Reaktion nach STAHL (29) auf Kohlenhydrate positiv aus.

Lipide (Dünnschichtchromatographie)

Der positive Ausfall der Phosphormolybdänsäure-Reaktion läßt auf die Anwesenheit von Lipiden schließen. In den Klistiermembranen beider Mückenarten können nach chromatographischer Auftrennung im Vergleich mit einer parallel aufgetragenen Testlösung Substanzen nachgewiesen werden, die sich nach ihren Wan-

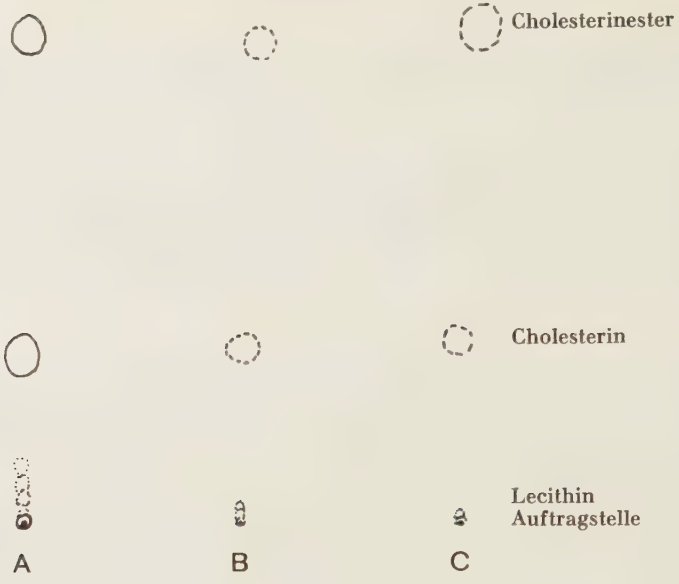


Abb. 1

Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm von je 10 Klistiermembranen von *Ae. aegypti* (B) und *An. stephensi* (C). Laufmittel: Chloroform, Nachweisreagenz: Phosphormolybdänsäure. Das Testgemisch (A) enthält Lecithin, Cholesterin und Cholesterinester.

derungswerten wie Cholesterin, Lecithine und Cholesterinester verhalten (Abb. 1).

Proteine (*in vitro*-Versuche)

Weder in den Klistiermembranen von *Ae. aegypti* noch in denen von *An. stephensi* können nach Andauung mit Trypsin durch die Kupfer-Folin-Reaktion Proteine nachgewiesen werden. Die Membranen von *Ae. aegypti* lösen sich während des Andauungsprozesses nicht auf, während diejenigen von *An. stephensi* in der (Trypsin-) Lösung zerfallen.

2. Histochemische und histologische Befunde

Die in den Extrakten der Klistiermembranen nachgewiesenen Stoffgruppen, Kohlenhydrate und Lipide wurden nun an histologischen Präparaten von Mitteldärmen, die Klistiermembranen enthielten, nachgewiesen. Anschließend verglichen wir die chemische Struktur der nach einer Blutmahlzeit gebildeten Membran mit derjenigen der Klistiermembran.

Die letzteren Untersuchungen führten wir bei *Ae. aegypti* 18 bis 24 Stunden, bei *An. stephensi* 28—36 Stunden nach Aufnahme der

Blutmahlzeit durch. Wie Sektionen bestätigen, sind zu diesen Zeiten die Membranen am deutlichsten ausgebildet.

a) Histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten und Lipiden bei Klistiermembranen

Aedes aegypti

PAS-Färbung

Im Membranmaterial können sowohl PAS-positive als auch braune, PAS-negative Stoffgruppen nachgewiesen werden. Beide Materialien lassen keine Struktur erkennen.

Sudanschwarz-B-Färbung

Neben den bräunlichen Membranbestandteilen finden sich im Darmlumen größere und kleinere Lipidtropfen. Diese können nie im bräunlichen Membranmaterial, sondern nur an und neben diesem beobachtet werden.

Anopheles stephensi

PAS-Färbung

Auch in den Klistiermembranen dieser Mückenart findet sich PAS-positives, unstrukturiertes Material, in welchem mitunter einzelne braune PAS-negative Grana auftreten.

Sudanschwarz-B-Färbung

Neben der braunen Grana, welche nur selten aufzutreten scheint, lassen sich Lipidtropfen von verschiedener Größe am Membranmaterial und im Darmlumen zeigen.

b) Histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten und Lipiden bei Membranen, die nach einer Blutmahlzeit gebildet wurden

Aedes aegypti

PAS-Färbung

Zwei Reaktionstypen der peritrophischen Zone auf die PAS-Färbung können festgestellt werden:

1. Es liegt zwischen Blutkuchen und Epithel eine durchgehende, unstrukturierte, zirka 4 μ starke, rosafarbene, PAS-positive Schicht (Abb. 2).
2. Eine braune, PAS-negative, lamellöse Struktur begrenzt den Blutkuchen gegen das Epithel hin (Abb. 3).

Zwischenstadien dieser Extremfälle, d. h. teilweise PAS-negative, teilweise PAS-positive peritrophische Zone, finden sich häufig.

Chitin-Nachweis

Alternierende, 7 μ dicke Schnitte wurden mit Chitinase behandelt. Nach der PAS-Färbung zeigte es sich, daß die braune, PAS-negative Struktur auf diese Weise aus den Schnitten herausgelöst werden konnte (Abb. 4, 5), während PAS-positive Zonen im peritrophischen Raum durch die Chitinase nicht angegriffen wurden. Abbildung 4 zeigt, daß die PAS-Färbung zur Darstellung der PM ungeeignet ist, da sowohl diese als auch der angedaute Blutkuchenrand dieselbe braune Farbe annehmen. Für den Chitinnachweis mit der Chitinasereaktion wäre möglicherweise die Kombination mit der Sudanschwarz-B-Färbung noch spezifischer.

Sudanschwarz-B-Färbung

Es kann im Blutkuchenrand, unmittelbar der Membranzone anliegend, eine durchschnittlich 2 μ starke, durchgehende Lipidschicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

Anopheles stephensi

PAS-Färbung

Bei dieser zweiten Mückenart findet sich in der peritrophischen Zone eine bräunliche, PAS-negative, ca. 3 μ dicke Granulation, die von PAS-positivem Material durchsetzt ist. In seltenen Fällen wird diese Granulation von kurzen Lamellenstückchen abgelöst.

Chitin-Nachweis

Die bräunliche Granulation kann, wie die Lamellenstrukturen bei *Ae. aegypti,* durch Chitinasebehandlung aus den Schnitten herausgelöst werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß dieses Ergebnis allein schon durch das wäßrige Medium des Puffergemischs zustande gekommen sei, führten wir die Reaktion an Kontrollschnitten, die in Pufferlösung ohne Zusatz von Chitinase eingestellt wurden, durch. Im Gegensatz zu der ersten Reaktion kann auf diese Weise die braune Granulation in der peritrophischen Zone nicht herausgelöst werden.

Sudanschwarz-B-Färbung

Eine wechselnd starke Lipidschicht als Begrenzung des Blutkuchens gegen den peritrophischen Raum kann hier ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 7).

c) Die nachgewiesenen Stoffe während der Blutverdauung

Um Aufschluß über die Bildungsweise und -zeit der PM zu erhalten, um abzuklären, was für eine Funktion die an ihrem Aufbau beteiligten Stoffe im Rahmen der Blutverdauung erfüllen, verfolgten wir das Auftreten der Kohlenhydrate und Lipide während eines ganzen Verdauungszyklus, vom Saugakt bis zum Ende der Blutverdauung.

Durch histochemische Reaktionen auf Haemoglobin und Proteine erhielten wir zusätzlichen Einblick in den Verlauf des Blutabbaus im Mitteldarmvolumen.

Bei der Besprechung der Präparate werden Epithel, Blutkuchen und peritrophische Zone getrennt geschildert. Es wird dabei immer das Gesamtbild und nie ausschließlich nur diejenigen für eine bestimmte histochemische Reaktion spezifischen Erscheinungen besprochen.

Aedes aegypti

Kohlenhydrate

Epithel

In den Präparaten, die zwischen 1 und 10 Stunden nach einer Blutmahlzeit hergestellt wurden, treten keine Kohlenhydrate im Epithel auf. Zwischen 10 und 20 Stunden erscheinen Kohlenhydrate hauptsächlich in den basalen Teilen der Epithelzellen, während apical zahlreiche «Vakuolen» auftreten (Abb. 8). Auf den Präparaten, die 20 bis 30 Stunden nach dem Saugakt gewonnen wurden, stellen wir keine Erhöhung der Kohlenhydratkonzentration im Epithel fest. Ebensowenig treten die Kohlenhydrate an einem bevorzugten Ort des Darmepithels, z. B. an einem der Pole, in besonders konzentrierter Form auf. Erst zwischen 30 und 35 Stunden tritt eine Zunahme der Kohlenhydrate auf, wobei weder der basale noch der apicale Zellteil bevorzugt wird.

Von 36 Stunden bis zum Ende der Blutverdauung, meistens zwischen 48 und 50 Stunden nach dem Saugakt, treten die Kohlenhydrate immer spärlicher, in manchen Präparaten überhaupt nicht mehr in Erscheinung. Parallel zu dieser Abnahme geht eine Zunahme der «Vakuolenbildung» in den apicalen Zellregionen.

Blutkuchen

In 1- bis 10stündigen Präparaten finden wir eine durchgehende PAS-positive Randzone des Blutkuchens gegen das Epithel. Das Darmlumen selbst zeigt, regellos verstreut, zahlreiche, rosa angefärbte Kohlenhydrat-Einschlüsse. In der Folge — 11 bis 22 Stun-

den nach dem Saugakt — ist der Darminhalt durchzogen von untereinander in Verbindung stehenden Kohlenhydratinselchen. Diese wiederum stehen mit der PAS-positiven Randzone, die den Blutkuchen gegen das Epithel hin lückenlos umgibt, in Verbindung. In seltenen Fällen ist diese Schicht deutlich vom Epithel abgesetzt, auf den meisten Schnitten jedoch liegt sie den Mitteldarmzellen direkt auf. Inwiefern es sich dabei bei ersterer Beobachtung um einen Artefakt handelt, sei dahingestellt.

Von zirka 22 Stunden an verschwinden die Kohlenhydratinseln und -schollen, die Randzone verliert mehr und mehr ihre PAS-Positivität, wird immer stärker und füllt gegen Ende der Blutverdauung, zwischen 48 und 50 Stunden, das gesamte Darmlumen aus.

Peritrophische Zone

Schon 1 Stunde nach der Blutmahlzeit ist der Darminhalt von einer beinahe lückenlosen Kohlenhydratschicht vom Epithel getrennt. Nach 18 Stunden ist diese Schicht 2 μ dick. Die Farbe verändert sich, bei einigen Präparaten früher, bei einigen später, von rot nach braun. Häufig ist die braune Schicht gegen das Epithel zu lamelliert. Dieser Farbwechsel läßt sich zeitlich nicht genau fixieren; je nach Verdauungszustand des Darminhalts tritt er zwischen 16 und 24 Stunden nach dem Saugakt ein.

Nach 24 bis 30 Stunden verstärkt sich die braune Randzone zentripetal; im peritrophischen Raum können weder lichtmikroskopisch noch mit dem Phasenkontrastmikroskop lamellige Strukturen beobachtet werden.

Lipide

Epithel

In den basalen Zellregionen von Mitteldärmen ungefütterter Mücken sind zahlreiche Fetttröpfchen vorhanden. Unmittelbar nach dem Saugakt können diese nicht mehr oder nur in geringer

---

Die in den Photographien verwendeten Abkürzungen:

Bl	=	Blutkuchen
E	=	Epithel
EF	=	Epithelfortsätze
KH	=	Kohlenhydrate
LE	=	Leber
Li	=	Lipide
LM	=	Lamellen
PM	=	peritrophische Membran
PZ	=	peritrophische Zone
SE	=	Sekrettropfen
St	=	Stäbchensaum
Vak	=	«Vakuolen»
vM	=	visköses Material

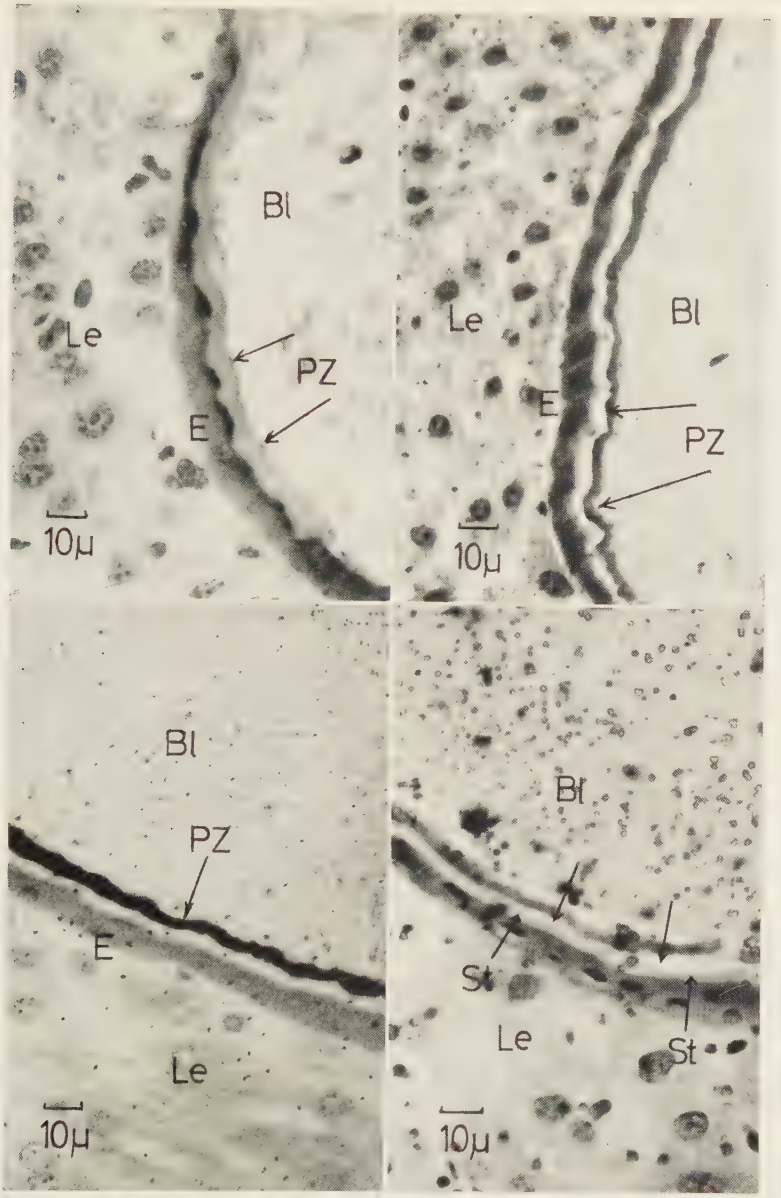
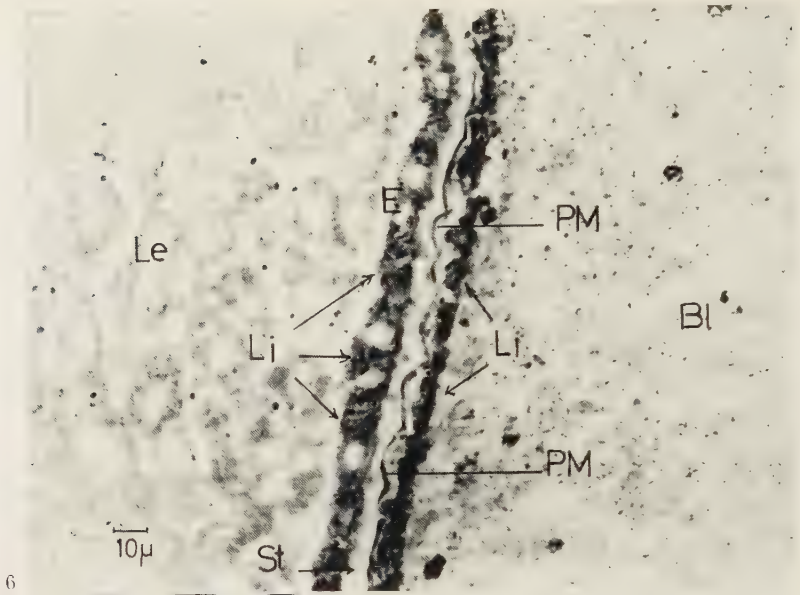


Abb. 2. Ae. aegypti PZ, 18 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung. Der Blutkuchen ist durch eine durchgehende PAS-positive Schicht PZ (Pfeile) vom Epithel getrennt.

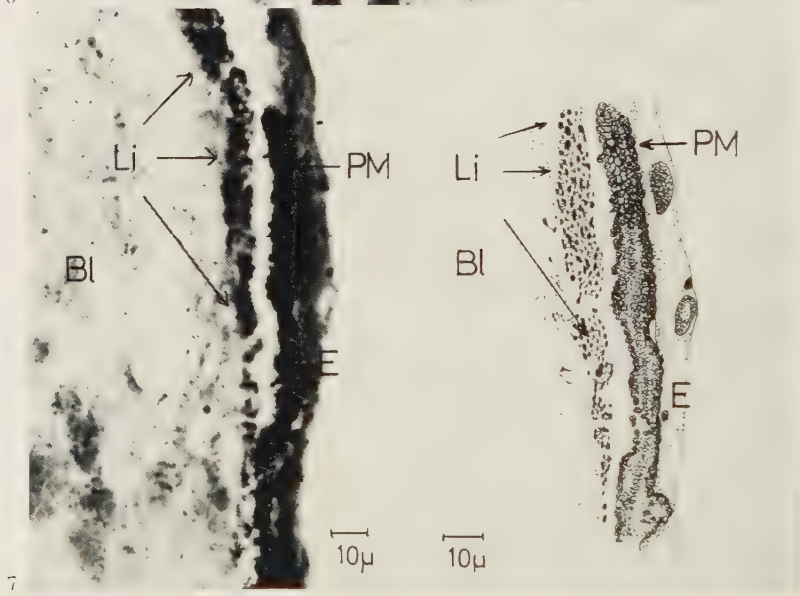
Abb. 3. Ae. aegypti PZ, 24 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung. Die Schicht in der peritrophischen Zone ist PAS-negativ geworden.

Abb. 4. Ae. aegypti PZ, 19 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung. Vergleichspräparat vor Chitinasebehandlung.

Abb. 5. Ae. aegypti PZ, 19 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung. Schnitt nach Chitinasebehandlung. Die Pfeile von oben zeigen an, wo die PM durch die Chitinase aus dem Schnitt herausgelöst wurde. Pfeile von unten: Stäbchensaum.



6



7

Abb. 6. Ae. aegypti 24 Stunden nach der Blutaufnahme. Sudanschwarz-B-Färbung/Kernechtrot. Im Epithel und im Blutkuchen sind Lipide als schwarze Punkte erkennbar. An der gegen den Blutkuchen gerichteten Seite der als braune, lamellöse Struktur erkennbaren PM ist eine Lipidanreicherung in Form einer schwarzen, granulierten Schicht erkennbar (Pfeile von rechts).

Abb. 7. An. stephensi 35 Stunden nach der Blutaufnahme. Sudanschwarz-B-Färbung/Kernechtrot. Die Zeichnung rechts zeigt die undeutlich erkennbaren Einzelheiten aus der Photographie: der braunen granulierten PM liegt auf der gegen den Blutkuchen gerichteten Seite eine schwarze Lipidschicht auf.

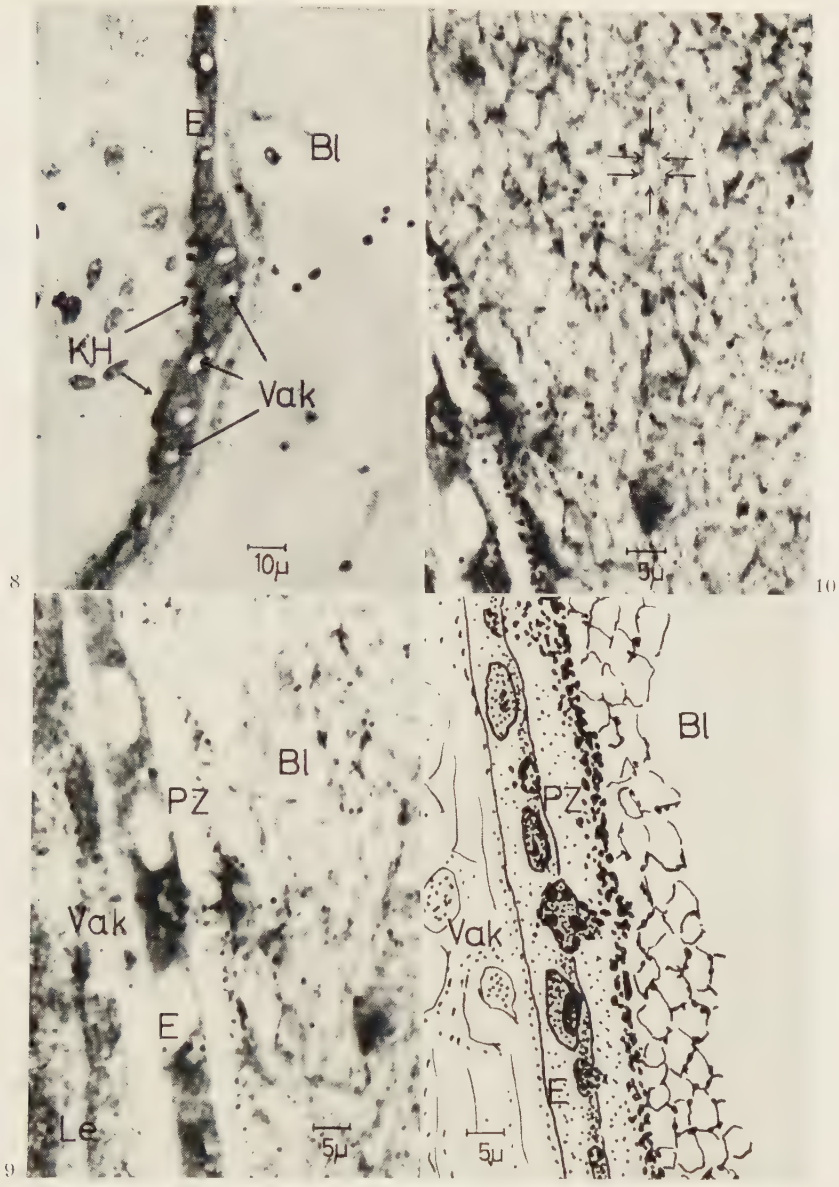


Abb. 8. Ae. aegypti 14 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung/Haematoxylin-Delafield. In den basalen Zellteilen treten, als schwarze Flecken sichtbar, Kohlenhydrate auf. In den apicalen Zellregionen können «Vakuolen» beobachtet werden.

Abb. 9. Ae. aegypti 1 Stunde nach der Blutmahlzeit. Sudanschwarz-B-Färbung/Kernechtrot. Eine «Vakuole» sezerniert ihren Inhalt in die peritrophische Zone.

Abb. 10. Der Blutkuchen nach Sudanschwarz-B-Färbung. Die Konturen der Erythrozyten sind wegen der an ihren Membranen haftenden Lipidtröpfchen (Pfeile) sichtbar.

Zahl nachgewiesen werden. Zwischen 15 und 20 Stunden treten in den Zellen, zuerst basal, später apical, «Fettvakuolen» auf. Inwieweit diese «Vakuolen» mit der Resorptions- oder der Sekretionstätigkeit in Zusammenhang stehen, kann nicht beurteilt werden (Abb. 9). Gegen Ende der Blutverdauung reichern sich die Zellen immer mehr mit Lipiden an.

Blutkuchen

In den ersten Verdauungsphasen zeigt der Blutkuchen eine «Craquelé»-Struktur, hervorgerufen durch feinste Fetttröpfchen, die an den Membranen der Erythrozyten haften und deren Konturen deutlich hervortreten lassen (Abb. 10). Zwischen Blutkuchenrand und Epithel ist die peritrophische Zone bereits nach 3 Stunden sichtbar. Der Blutkuchenrand ist zu dieser Zeit mit Lipidtröpfchen stark angereichert. 18 Stunden nach der Blutmahlzeit ist der Blutkuchen gleichmäßig von feinsten Lipidtröpfchen durchsetzt.

Mit fortschreitender Blutverdauung, 18 bis 28 Stunden nach dem Saugakt, treten in der lipidreichen Randzone braune Körner auf, die sich verdichten und bald einen zusammenhängenden Ring, in dem vereinzelte Lipidtropfen nachgewiesen werden können, um den Blutkuchen bilden.

Nach 48 Stunden hat sich die braune Granulation gegen das Blutkuchenzentrum hin ausgebreitet und erfüllt, zusammen mit großen Lipidinseln, das gesamte Lumen.

Peritrophische Zone

Bis 7 Stunden nach dem Saugakt können in der peritrophischen Zone feinste Fetttröpfchen nachgewiesen werden. Zwischen 7 und 24 Stunden wird diese Schicht vom Analpol her von einer braunen, nach 24 Stunden durchgehenden, an manchen Stellen aus mehreren Lamellen bestehenden Struktur abgelöst. In ihr lassen sich keine Lipide mehr zeigen; wir identifizieren diese Lamellenstruktur mit der PM.

Auf 48stündigen Präparaten kann sie nicht mehr mit Sicherheit gezeigt werden, da auch der Darminhalt braun gefärbt ist.

Haemoglobin und Peroxydasen

Epithel

5 Stunden nach der Blutmahlzeit treten im Epithel erstmals einzelne, blaue, benzidinpositive Körnchen auf. Diese sind im gesamten Zellkörper regellos verteilt. Mit fortschreitender Blutverdauung nimmt diese Granulation zu, bis nach etwa 43 Stunden ein Maximum beobachtet werden kann. Mit Ausnahme der Zellkerne ist dann der gesamte Zellkörper, mit deutlicher Bevorzugung der api-

calen Region, blau granuliert. Der Stäbchensaum ist bis 8 Stunden nach der Aufnahme der Blutmahlzeit benzidinnegativ. Ab 8 Stunden bis zum Ende der Blutverdauung ist er mit benzidinpositiver Granulation angereichert.

Auf späteren Schnitten — zwischen 50 und 54 Stunden nach der Blutmahlzeit — sind sowohl in den Epithelzellen als auch im Stäbchensaum mit dieser Reaktion keine Strukturen mehr anfärbbar.

Blutkuchen

Der benzidinpositiv gefärbte Blutkuchen berührt auch in den ersten Stunden der Verdauung das Epithel nicht direkt. Dazwischen findet sich ein benzidinnegativer, schmaler Streifen, der sich mehr oder weniger scharf vom Blutkuchen abhebt.

In den meisten Präparaten können die Erythrozyten, sofern sie noch nicht angedaut sind, als blau gefärbte, klar konturierte Plättchen erkannt werden.

Der Blutkuchen ist nicht gleichmäßig blau gefärbt, sondern er wird von verstreuten, unanfärbbaren Inseln durchzogen, in denen sich keine Erythrozyten befinden. Die äußere Randzone ist auf 1- bis 6stündigen Präparaten weniger intensiv blau gefärbt als die zentralen Partien. 8 Stunden nach dem Saugakt läßt sich der Blutkuchenrand in der Analzone nicht mehr mit Benzidin anfärben; er nimmt fortan eine gelbbraune Farbe an. Zwischen 12 und 16 Stunden nach dem Saugakt breitet sich diese Schicht weiter aus, zudem hat sich ihre Farbe verändert: sie ist tiefbraun und sitzt der noch benzidinpositiven Masse des Blutkuchens in der Analregion und lateral gegen den Vorderpol zu wie eine Kappe auf. Ihre Stärke ist überall gleich und beträgt zirka 2 μ. Von der peritrophischen Zone lumenwärts ist nun ein zirka 4 μ starker gelbbrauner Streifen zu beobachten, der sich vom restlichen Blutkuchen scharf abhebt (Abb. 11).

Nach zirka 18 Stunden bildet der Blutkuchenrand eine tiefbraune, ungefähr 5 μ dicke Schicht, die während der nächsten 12 Stunden nur in der Analzone minim an Stärke zunimmt. Nach zirka 30 Stunden bis zum Ende der Blutverdauung dehnt sich diese Schicht zentripetal weiter aus und erfüllt nach ungefähr 48 Stunden annähernd das gesamte Darmlumen.

Peritrophische Zone

Die peritrophische Zone erweist sich bis ungefähr 7 Stunden nach der Blutmahlzeit als benzidinnegativ. Zwischen 8 und 16 Stunden beobachten wir in der Membranzone eine gelbbraune Schicht. Auf 16 bis 24 Stunden alten Präparaten beobachtet man am äußeren, gegen den Stäbchensaum hin gerichteten Teil dieser

Zone eine lamellige, braune Struktur. Diese entspricht der peritrophischen Membran. Mit fortschreitender Blutverdauung verbreitert sich der Raum zwischen Stäbchensaum und PM und ist erfüllt mit benzidinpositivem Material.

Ungefähr 50 Stunden nach dem Saugakt ist in der peritrophischen Zone weder die peritrophische Membran sichtbar, noch sind durch Benzidin anfärbbare Strukturen vorhanden.

Proteine

Epithel

In den ersten 8 Stunden nach dem Saugakt hebt sich das Epithel vom Blutkuchen als gestrecktes, intensiver blau gefärbtes Band ab. Der Stäbchensaum und die abgeflachten Kerne fallen durch die intensivste Blaufärbung auf.

Auf die morphologischen Veränderungen zwischen 8 und 18 Stunden nach dem Saugakt gehen wir im einzelnen nicht ein, sondern verweisen auf die Arbeiten Freyvogel et al. (13) und Stohler (31), die wir bestätigen können. Zwischen 18 und 28 Stunden treten im ganzen Darmepithel, jedoch verstärkt in der Analzone, «Vakuolen» auf. Sie finden sich in den basalen Zellpartien, meist in unmittelbarer Kernnähe. In den folgenden 10 Stunden verstärken sich die «Vakuolen» kaum, sie bleiben auf den basalen Zellteil beschränkt. Gegen Ende der Blutverdauung, nach zirka 48 Stunden, können sie nicht mehr beobachtet werden.

Blutkuchen

Während der ersten 8 Stunden erscheint der Blutkuchen blau bis violett angefärbt. Auf allen Präparaten können an einzelnen Stellen Erythrozyten erkannt werden. Nach 3 Stunden bereits liegt zwischen Epithel und Blutkuchenrand eine schmale, von Hg-Bromphenolblau nicht angefärbte, durchgehende Schicht. Die Randpartie des Blutkuchens verändert sich nach 8 Stunden folgendermaßen: vom Analpol zieht sich eine Schicht, deren Farbe von Blau über Gelb in Gelbbraun übergeht und in der Erythrozyten nicht mehr erkannt werden können. Zwischen 18 –28 Stunden nach dem Saugakt ist eine tiefbraun gefärbte durchschnittlich 5 μ dicke Randzone erkennbar. Ab zirka 30 Stunden verstärkt sich die Randzone, beginnend am Analpol, und füllt gegen das Ende der Blutverdauung, nach 45 bis 50 Stunden, annähernd das gesamte Darmlumen aus. Einzelne, geringe Hg-Bromphenolblau-positive Stellen im Zentrum des Mageninhalts können allerdings noch nach 54 Stunden gezeigt werden.

Peritrophische Zone

Eine Stunde nach der Blutaufnahme liegt zwischen Blutkuchen und Stäbchensaum stellenweise ein schmaler, Hg-Bromphenolblaunegativer Streifen, der nach 3 Stunden durchgehend ist und an Stärke zugenommen hat.

Nach 8 Stunden färbt sich, zuerst anal, in späteren Stadien lateral gegen vorne fortschreitend, die peritrophische Zone bräunlich. Frühestens nach 16 Stunden treten am Analpol stark gefältelte Lamellen an der Grenze des Blutkuchens gegen den Stäbchensaum auf. Nach zirka 18 Stunden umgibt diese Struktur den Mageninhalt vollständig.

Gegen Ende der Blutverdauung kann zwischen PM und angedauten Blutresten nicht mehr unterschieden werden — beide erscheinen braun.

Anopheles stephensi

Kohlenhydrate

Epithel

Im Gegensatz zu den Epithelzellen von *Ae. aegypti* können bei dieser Mückenart während des gesamten Verdauungszyklus Kohlenhydrate in unterschiedlicher Menge nachgewiesen werden.

Unmittelbar nach der Blutmahlzeit sind sie in geringer Konzentration vorhanden und nehmen dann bis zirka 48 Stunden nach dem Saugakt stetig zu. Zwischen 36 und 48 Stunden ist ihre Konzentration so hoch, daß Zellelemente nicht mehr unterschieden werden können.

Im Gegensatz zu *Ae. aegypti* sind die Epithelzellen nach der Blutmahlzeit nicht in gleicher, bandartiger Weise gestreckt. Auf den meisten 1- bis zirka 36-Stunden-Präparaten beobachtet man Zellen, die wellenförmig ins Lumen hineinragen. Auf den «Wellenkämmen» sind oftmals auch Kohlenhydrate nachweisbar (Abbildung 12).

Während des ganzen Verdauungszyklus treten «Vakuolen» in wechselnder Stärke auf. Nach 48 Stunden nimmt die «Vakuolisierung» zu, während die Kohlenhydratkonzentration im gesamten Epithel sehr rasch abnimmt.

In 55- bis 65-Stunden-Präparaten lassen sich nur noch spurenweise Kohlenhydrate im apicalen Zellteil erkennen.

Blutkuchen

Nach dem Saugakt zeigt der Blutkuchen während der ersten 3 Stunden eine homogene, gelblichweiße Färbung. Zwischen 3 und

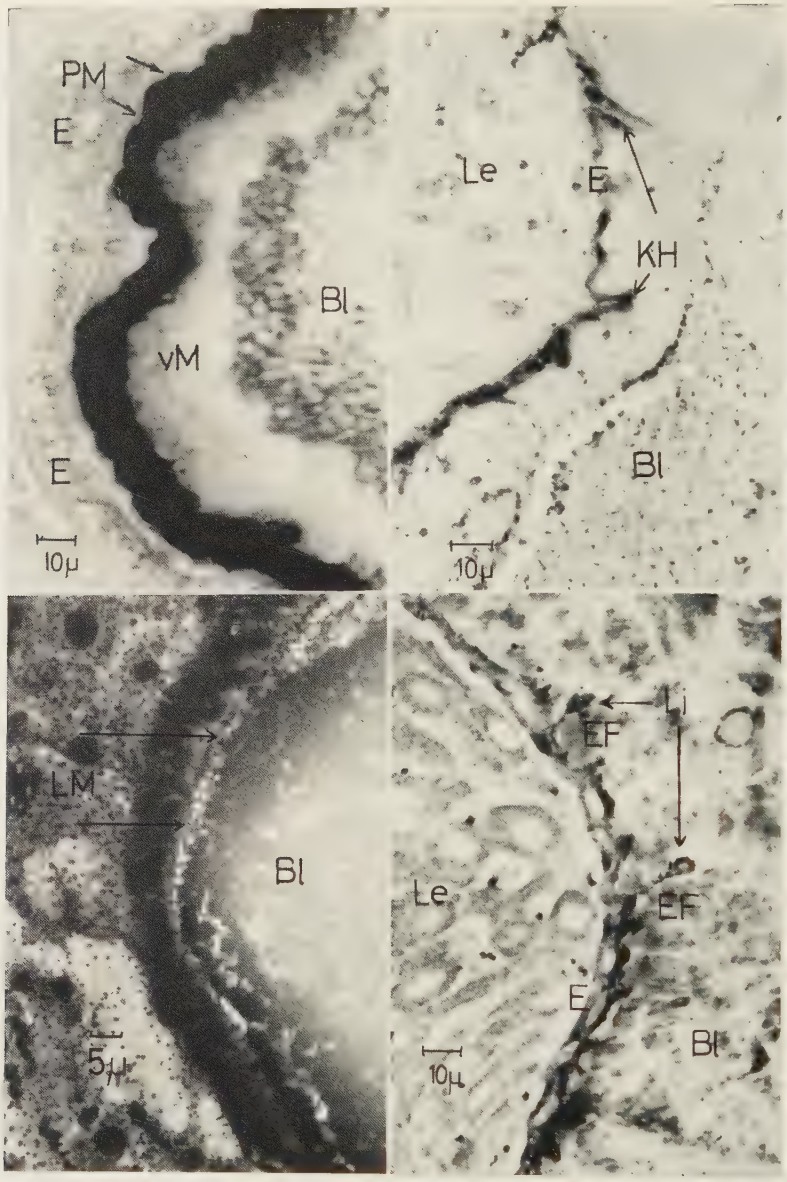


Abb. 11. Ae. aegypti 28 Stunden nach der Blutaufnahme. Benzidintest. Angelagert an das Epithel findet sich eine braune Schicht angedauten Blutes, die gegen das Epithel von der schwach braunen PM (Pfeil) begrenzt wird. Auf diese Schicht folgt lumenwärts ein gelblich-braunes viskoses Material, in dem keine Erythrozyten beobachtet werden können. Scharf von dieser Zone abgegrenzt erscheint die noch unverdaute Masse des Blutkuchens, in der einzelne Erythrozyten als blaue benzidinpositive Plättchen klar erkennbar sind.

12 Stunden ist er von weißen, nicht angefärbten Flecken unterschiedlicher Größe durchsetzt.

Nach 12 Stunden tritt, vorerst anal, am Rande des Blutkuchens eine braunrote Granulation auf. Sie sitzt dem Blutkuchen gegen das Epithel hin auf. Zwischen 20 und 30 Stunden nach dem Saugakt bildet diese Granulation eine kompakte, zirka 2 μ starke, durchgehende Schicht, die vom restlichen Blutkuchen scharf abgegrenzt ist.

Auf 30- bis 48-Stunden-Präparaten ist der Blutkuchen durchsetzt von großen, gelblichen Inseln. Auf alternierenden Schnitten erweisen sich diese als Sudanschwarz-B-positiv. Die braune Granulation hat an Stärke zugenommen; sie füllt, zusammen mit den gelblichen Inseln, gegen das Ende der Blutverdauung das gesamte Darmlumen aus.

In fortgeschrittenen Verdauungsstadien, 36 bis 54 Stunden nach der Blutmahlzeit, liegt der Blutkuchen nicht mehr ganz dem Epithel an. Im Darmlumen können Kohlenhydrate noch vereinzelt nachgewiesen werden.

Peritrophische Zone

In den ersten 12 Stunden nach dem Saugakt reicht die Blutmahlzeit bis an das Epithel. Die peritrophische Zone ist nicht sichtbar.

Mit dem Auftreten der braunen bis braunroten Granulation als Begrenzung des Blutkuchenrandes zwischen 12 und 30 Stunden nach dem Saugakt wird die peritrophische Zone sichtbar. Die braunrote Granulation liegt nicht mehr unmittelbar dem Stäbchensaum an.

Die peritrophische Zone ist erfüllt mit PAS-positivem Material, in dem sich in seltenen Fällen kurze Lamellenstückchen unterscheiden lassen (Abb. 13).

Abb. 12. An. stephensi 4 Stunden nach der Blutmahlzeit. PAS-Färbung/Haematoxylin-Delafield. In den lumenwärts gerichteten Teilen der Epithelzellen treten Kohlenhydrate auf (Pfeile).

Abb. 13. An. stephensi 27 Stunden nach der Blutaufnahme. PAS-Färbung/Haematoxylin-Delafield. Im granulösen braunen PM-Material können mitunter kürzeste Lamellenstückchen beobachtet werden. (Zur besseren Unterscheidung der dunklen peritrophischen Zone vom ebenfalls dunkel gefärbten Blutkuchen wurde die rechte Seite der Photographie aufgehellt.)

Abb. 14. An. stephensi 4 Stunden nach der Blutaufnahme. Sudanschwarz-B-Färbung. Die tropfenförmigen Epithelfortsätze weisen an ihren lumenwärts gerichteten Teilen Lipidtropfen (Pfeile), erkennbar als schwarze Punkte, auf.

Bis zum Ende der Blutverdauung verändert sich die peritrophische Zone nicht mehr.

Lipide

Epithel

Die Epithelzellen der ungefütterten Mücken enthalten regellos verteilte Lipidtröpfchen, während im Stäbchensaum keine Lipide nachgewiesen werden können.

Auf 1-Stunden-Präparaten beobachten wir Lipide auch im Stäbchensaum, die den Eindruck einer gleichmäßigen Front erwecken. Bis 18 Stunden nach dem Saugakt ist keine Veränderung des Lipidgehalts der Zellen zu beobachten. Von 20 Stunden an bis zum Ende der Blutverdauung nimmt der Gehalt an Lipiden vor allem in den basalen Zellteilen zu.

Während 1 bis 30 Stunden nach dem Saugakt ragen an den Stellen, wo der Blutkuchenrand noch nicht von der bekannten braunroten Granulation besetzt ist, aus dem Epithelverband lipidhaltige Zellenfortsätze ins Lumen, die stärker angefärbt sind als die übrigen Partien des Epithels (vgl. Abb. 14 und 17).

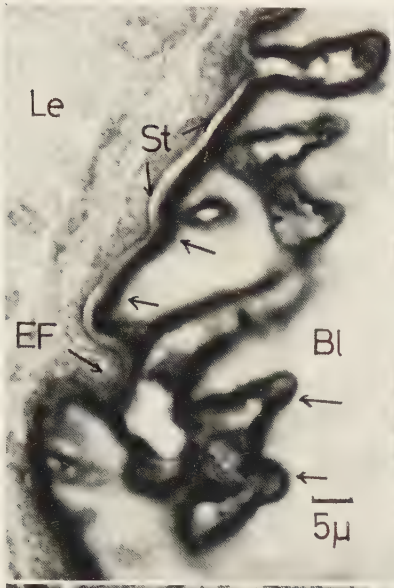
Blutkuchen

Der Blutkuchen berührt in den ersten Stunden nach dem Saugakt das Epithel direkt. Er weist eine «Craquelé»-Struktur auf, wie wir sie bereits bei *Ae. aegypti* kennengelernt haben. Seine Masse wird durchzogen von mehreren Lipidfronten, deren Enden mitunter in den Stäbchensaum auslaufen.

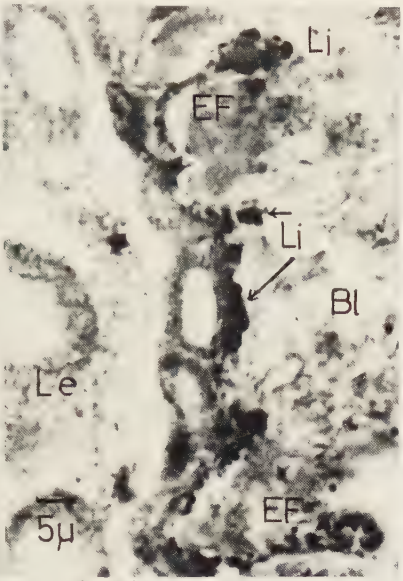
Nach zirka 6 Stunden beobachtet man im Blut größere, lipidhaltige Inseln, die sich mit fortschreitender Blutverdauung vereinigen. Nach zirka 24 Stunden bilden diese Inseln im Zentrum des Blutkuchens eine zusammenhängende Zone. Gegen das Epithel hin geht sie über in eine braune Granulation, die von größeren Lipideinschlüssen unterbrochen ist. Diese Granulation und große Lipidinseln erfüllen gegen Ende der Blutverdauung das Mitteldarmlumen vollständig.

Peritrophische Zone

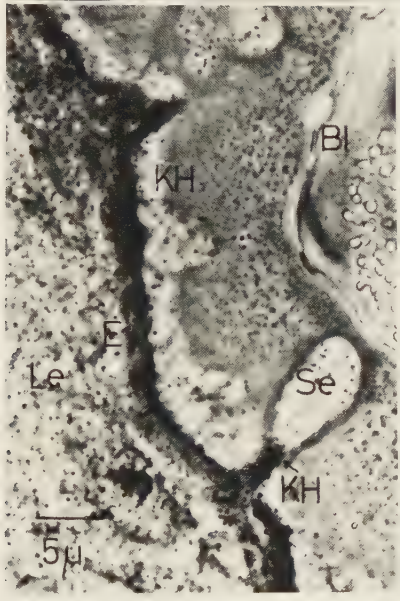
Die peritrophische Zone ist erst nach 6 Stunden mit dem Auftreten der braunroten Granulation erkennbar. Auf 12- bis 30-Stunden-Präparaten erfüllt letztere als zirka 3—4 μ dicke Schicht den peritrophischen Raum durchgehend. Eine Lipidschicht, die der Granulation in der peritrophischen Zone vorausgeht, oder irgendeine lamellige Struktur, wie sie bei *Ae. aegypti* auftreten, konnten hier nicht beobachtet werden.



15



17



16

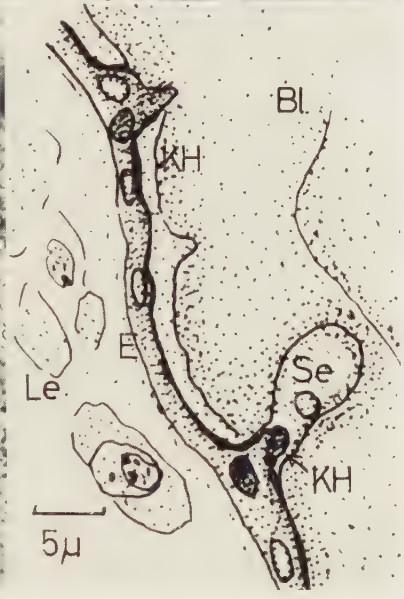


Abb. 15. An. stephensi. Sezernierende Epithelzellen. 2 Stunden nach der Blutaufnahme. Hg-Bromphenolblau-Färbung. Die apicale Region der Epithelzellen und der Stäbchensaum sind lumenwärts vorgewölbt. Die Randzone des Blutkuchens ist intensiver blau gefärbt (Pfeile) als der restliche Teil.

Abb. 16. An. stephensi. Sezernierende Zellen. 2 Stunden nach der Blutaufnahme. PAS-Färbung. Phasenkontrastaufnahme. Bei der Zelle rechts unten im Bild Sekrettropfen kurz vor der Ablösung von der Epithelzelle. An der Basis befindet sich eine Kohlenhydratanhäufung.

Abb. 17. An. stephensi 2 Stunden nach der Blutaufnahme. Die Sudanschwarz-B-Färbung läßt Epithelzellen erkennen, welche tropfenförmige, lipidhaltige Sekrete ins Lumen sezernieren.

Haemoglobin und Peroxydasen

Epithel

Während der ganzen Dauer der Blutverdauung kann im Epithel eine spärliche, benzidinpositive Granulation beobachtet werden, deren Konzentration unverändert bleibt.

Blutkuchen

Im Blutkuchen lassen sich hier einzelne Erythrozyten nicht erkennen. Unregelmäßige nicht angefärbte Stellen unterbrechen sowohl in der Randzone als auch im Zentrum die benzidinpositive Masse.

In 8- bis 12-Stunden-Präparaten können die ungefärbten Stellen einerseits als wolkenartige Gebilde ohne bestimmte Form und anderseits als «Schollen» auftreten, die sich, vom Epithel ausgehend, in wechselnder Stärke ins Lumen erstrecken. An diesen Stellen wölben sich auch die apicalen Teile der Epithelzellen mit dem Stäbchensaum lumenwärts (Abb. 15).

Nach 8 bis 12 Stunden beobachtet man am Analpol das Auftreten einer braunen Granulation. In einigen seltenen Fällen begrenzt auf kürzester Strecke eine lamellige Struktur diese Granulation gegen das Epithel hin. Im weiteren Verlauf der Blutverdauung verstärkt sich die braune Granulation und umgibt zwischen 20 und 30 Stunden den Blutkuchen in gleichmäßiger Stärke von zirka 6 μ. Zur gleichen Zeit nehmen die benzidinnegativen Stellen an Zahl und Größe zu; auch können keine Epitheleinstülpungen mehr festgestellt werden.

34 bis 42 Stunden nach der Blutmahlzeit ist der Darminhalt nur noch an wenigen, zentral gelegenen Stellen benzidinpositiv. Der weitaus größte Teil des Lumens weist eine braune Granulation auf, die von großen gelblichen Inseln durchsetzt ist. Dieses Bild bleibt bis zum Ende der Blutverdauung gleich.

Peritrophische Zone

Bis zum Auftreten der braunen Granulation, welche den Blutkuchen umgibt, wird eine peritrophische Zone nicht sichtbar. Dies gilt auch für den Stäbchensaum.

Die peritrophische Zone wird erst zwischen 32 und 48 Stunden sichtbar, wenn der Blutkuchenrand und ein großer Teil des Darmlumens braun granuliert sind.

Sie erscheint von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende der Blutverdauung als farblose bis leicht benzidinpositive Schicht, die in seltenen Fällen eine lamellige Struktur annimmt.

Proteine

Epithel

Auf 1- bis 6-Stunden-Präparaten erscheint das Epithel als flaches, zart blaues Band, das sich vom Blutkuchen deutlich abhebt. Bei starker Vergrößerung lassen sich Zellkerne und Stäbchensaum als stärker blaugefärbte Strukturen erkennen. Einige Epithelzellen erstrecken sich, zuerst am Analpol, fingerförmig ins Lumen. An diesen Stellen tritt der blauviolette Stäbchensaum am deutlichsten hervor. Zwischen 1—6 Stunden nach dem Saugakt sind diese Epithelfortsätze außer in der Analzone nicht oder nur andeutungsweise vorhanden. Sie verschwinden nach 6 Stunden am Analpol, treten dann aber am Vorderende und lateral auf. In der Stäbchensaumregion der Analzone erscheint eine feine braune Granulation. Nach zirka 30 Stunden bis zum Ende der Blutverdauung sind die basalen Zellteile stark vakuolisiert.

Blutkuchen

In den ersten 4 Stunden nach der Blutmahlzeit erscheint der Blutkuchen blauviolett angefärbt, außer einzelnen Randpartien, wo schwächer angefärbte Stellen sichtbar sind. Diese ragen fingerförmig, vom Epithel ausgehend, ins Lumen. Die Ränder dieser Einstülpungen sind intensiv blau gefärbt (vgl. Abb. 15). Diese Fortsätze treten bis 6 Stunden nach dem Saugakt immer zahlreicher auf. Nach 8 Stunden tritt eine braune Granulation zuerst in der Analpartie des Blutkuchenrandes auf. Die braune Granulation nimmt stetig an Stärke zu und umgibt nach zirka 30 Stunden den Blutkuchen vollständig. Auf 33-Stunden-Präparaten ist der blauviolett gefärbte Darminhalt von gelben Inseln, deren Rand braun granuliert ist, durchsetzt.

Bis zum Ende der Blutverdauung nimmt die Blaufärbung des Lumens in dem Maße ab, wie die gelbbraunen Inseln und die braune Granulation zunehmen. Letztere erfüllt gegen Ende der Blutverdauung das gesamte Darmlumen.

Peritrophische Zone

Die peritrophische Zone ist bis zirka 5 Stunden nach der Blutmahlzeit nicht erkennbar. Auf 6-Stunden-Präparaten tritt im analen peritrophischen Raum eine gelbbraune Schicht, von feinster brauner Granulation durchsetzt, auf. Diese Granulation nimmt bis zirka 30 Stunden nach dem Saugakt zu und bildet den Blutkuchenrand von 3—4 μ Dicke. Dann tritt zwischen Blutkuchenrand und Epithelzellen ein schmaler, zirka 1 μ breiter, gelbbrauner Streifen zuerst anal auf, der nach 34 Stunden die gesamte Blutmahlzeit umgibt. Diese peritrophische Zone kann an

wenigen Stellen eine geschichtete Struktur aufweisen. Gegen Ende der Blutverdauung können diese lamellösen Strukturen nicht mehr gezeigt werden.

3. Ergebnisse weiterer Versuche

a) Vorversuche am Kryostaten

Da alle histochemischen Untersuchungen an Kryostatschnitten durchgeführt wurden, lag uns daran zu prüfen, ob die PM auf Kryostatschnitten nach Azanfärbung auf dieselbe Art erscheint wie auf Paraffinschnitten, wo sie als blauer Saum den Blutkuchen vom Epithel trennt.

Wir modifizierten daher die eingangs angegebene Methode zur Herstellung von Kryostatschnitten folgendermaßen:

1. Nach vorsichtigem Entfernen des Darmepithels wurden die verbleibenden, nur noch von der PM umgebenen Blutkuchen geschnitten und mit Azan gefärbt.
2. Vom Blutkuchen absezierte peritrophische Membranen wurden geschnitten und mit Azan gefärbt.
3. Ganze, blutgefüllte Mitteldärme wurden zu Zeiten der deutlichsten Membranausbildung geschnitten und mit Azan gefärbt.

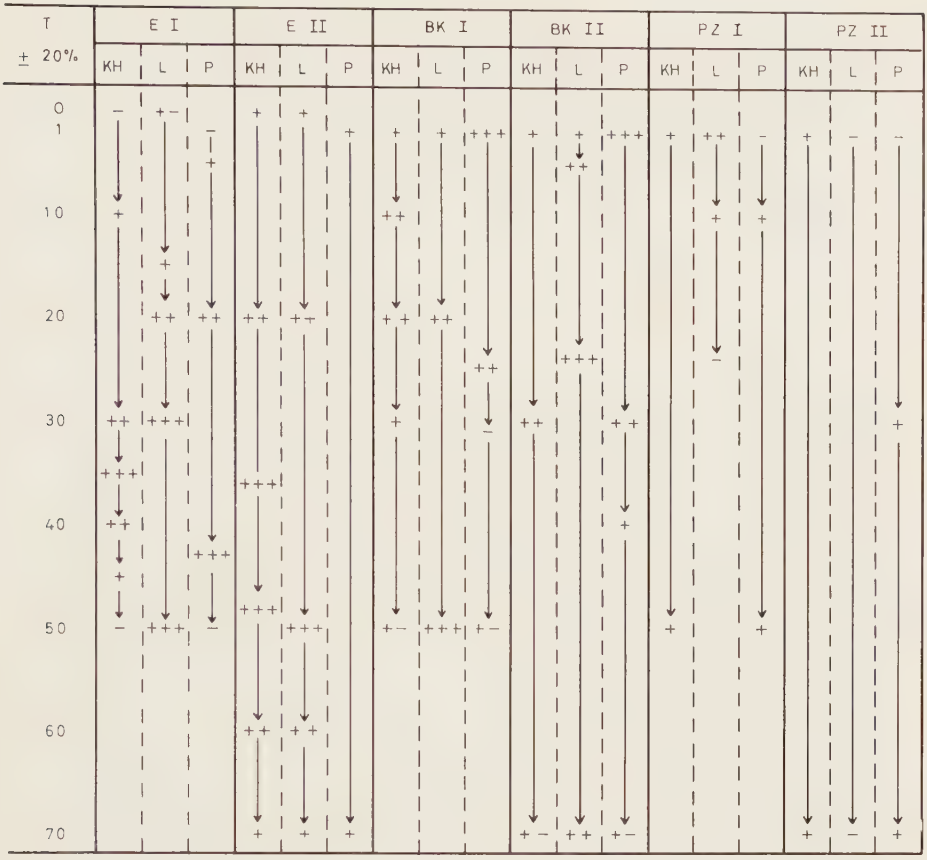
Die PM ist nach jeder dieser Modifikationen darstellbar. Sie erscheint auch auf Kryostatschnitten nach Azanfärbung als blauer Saum.

b) Das Verhalten der PM von *Anopheles stephensi* in einem unpolaren Lösungsmittel

Die Vermutung, daß die Wasserlöslichkeit der PM auf in ihr enthaltenen polaren Strukturen beruhe, welche im dipolaren Wasser (Dielektriziätskonstante 81) auseinanderfallen, wurde folgendermaßen geprüft:

Vom Blutkuchen absezierte peritrophische Membranen wurden in mit Chloroform gefüllte Blockschalen gebracht. In diesem Lösungsmittel mit einer Dielektrizitätskonstante von 5 konnte keine Auflösung der Membranen beobachtet werden. Der Versuch wurde nach 4 Stunden abgebrochen. Im Vergleich dazu lösten sich Membranen, die zur Kontrolle in mit Wasser gefüllte Blockschalen eingelegt wurden, innerhalb einer halben Stunde auf.

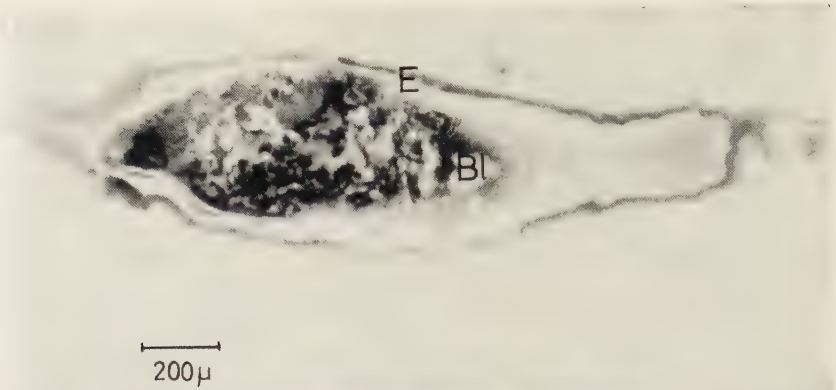
TABELLE 1



I: *Ae. aegypti* II: *An. stephensi* E: Epithel BK: Blutkuchen PZ: peritrophische Zone KH: Kohlenhydrate L: Lipide P: Proteine (Resultate Benzidintest)
−: keine +−: sehr wenige +: wenige ++: verstärkt +++: sehr stark

4. Zusammenfassung der Resultate

1. An Kryostatschnitten ist die peritrophische Membran beider Mückenarten darstellbar. Nach Azanfärbung zeigt sie sich gleich wie in Paraffinschnitten: als blau gefärbtes Band zwischen Blutkuchen und Darmepithel.
2. Die chemische Analyse der Klistiermembranen von *Ae. aegypti* und *An. stephensi* weist auf die Anwesenheit von Kohlenhydraten und Lipiden im Membranmaterial hin. Bei den letzteren handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Cholesterin, Lecithine und Cholesterinester.



18

19

Abb. 18. Paraffineingebetteter, blutgefüllter Mückendarm. Der Blutkuchen ist vom Epithel abgesetzt und teilweise aus dem Schnitt gelöst. Diese Aufnahme wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. A. FREYVOGEL zur Verfügung gestellt. Sie wurde in einer seiner Arbeiten (13) publiziert.

Abb. 19. Kryostatschnitt eines blutgefüllten Mückendarmes. Der Blutkuchen liegt dem Epithel vollständig an; sämtliche Strukturen sind erhalten.

3. Mit histochemischen Methoden an Klistiermembranen und an Membranen, die nach Blutmahlzeiten gebildet wurden, lassen sich Kohlenhydrate nachweisen. Mit der Sudanschwarz-B-Reaktion können jedoch im Membranmaterial keine Lipide gezeigt werden. Bei beiden Mückenarten läßt sich die PM durch Andauung mit Chitinase aus den Schnitten herauslösen.
4. Sowohl bei *Ae. aegypti* als auch bei *An. stephensi* ist die PM ein Produkt epithelialer Sekrete. Bei *Ae. aegypti* sezernieren alle Zellen gleichzeitig in apokriner Weise, bei *An. stephensi* wird eine Variante des merokrinen Sekretionstypus beobachtet: die Zellen wölben sich ins Darmlumen vor und scheiden dann tropfenförmiges Sekretionsmaterial aus.
5. Die histochemischen Untersuchungen, welche sich über die Dauer einer ganzen Blutmahlzeit erstrecken, können tabellarisch zusammengefaßt werden (vgl. Tab. 1).
6. Die wasserlösliche PM von *An. stephensi* verliert ihre Löslichkeit in Chloroform, einem unpolaren Lösungsmittel.

IV. Diskussion der Resultate

1. Diskussion der Methoden

Entsprechend der in der Einleitung skizzierten Fragestellung versuchten wir, durch andere als bisher verwendete Methoden Einblick in den Ablauf der Blutverdauung und den mit diesem Vorgang in enger Verbindung stehenden Problemkreis der peritrophischen Membran zu gewinnen.

Unseres Wissens wurden Untersuchungen über den Ablauf der Blutverdauung und über Sekretionsvorgänge bei Culiciden bis anhin nur an Paraffinschnitten und an elektronenmikroskopischen Präparaten durchgeführt. Vergleichende Versuche mit Paraffin- und Kryostatschnitten ließen uns jedoch zum Schluß kommen, daß histologische Präparate fixierter und paraffineingebetteter, blutgefüllter Objekte die natürlichen Zustände viel weniger real wiedergeben, als dies bei Kryostatschnitten der Fall ist. Dies veranschaulicht die Abbildung 18 eines paraffineingebetteten, blutgefüllten Mückendarms. Der Blutkuchen ist an manchen Stellen bis zirka 50 μ vom Epithel abgesetzt und teilweise aus dem Schnitt gelöst, während auf Abbildung 19, einem Kryostatschnitt eines gleichen Objekts, der Blutkuchen dem Epithel vollständig anliegt, wobei seine sämtlichen Strukturen erhalten sind. Anderseits erscheinen Zellorganellen auf Kryostatschnitten nicht so deutlich und scharf abgegrenzt wie auf Paraffinschnitten. Aus diesem

Grunde können zytologische Veränderungen, wie sie FREYVOGEL (13) während des Ablaufs der Blutverdauung beschreibt, an Kryostatschnitten nicht oder nur begrenzt festgestellt werden.

Da jedoch die Untersuchung zytologischer Vorgänge für unsere Arbeit von untergeordneter Bedeutung war, führten wir alle histochemischen Reaktionen an Kryostatschnitten durch. Mit diesen sollte einerseits der Aufbau und die Entstehung der PM und anderseits der Abbau der drei organischen Hauptnährstoffe, der Eiweiße, der Kohlenhydrate und der Lipide verfolgt und geprüft werden. Es zeigte sich, daß mit der PAS-Reaktion Vorstufen der PM sowie Kohlenhydratkomponenten der Blutmahlzeit und der Epithelzellen erfaßt werden können. Ungeeignet jedoch ist diese Reaktion zur Darstellung der vollständig ausgebildeten, PAS-negativen peritrophischen Membran. Diese nimmt dann eine braune Farbe an und kann nur in Ausnahmefällen von den ebenfalls braun gefärbten Randpartien des bereits angedauten Blutkuchens unterschieden werden.

Die Darstellung der PM in Schnittpräparaten ist ein Kernproblem aller bisher über diese Struktur erschienenen Arbeiten. Schon STOHLER (31) erwähnt, daß sich die PM nach Azanfärbung gleich wie das anliegende Blut (blau) anfärbt. Auch die von uns angewandte Chitinasereaktion, welche als Methode zur negativen Darstellung der PM aufgefaßt werden kann, ergibt keine restlos befriedigende Resultate, weil sie auch den Blutkuchenrand teilweise angreift. Bessere Resultate zur Darstellung der vollständig ausgebildeten PM erzielten wir mit der Sudanschwarz-B-Färbung. Mit dieser Lipidfärbung läßt sich die PM als braune, lamellige Struktur bei *Ae. aegypti* und als braune Granulation bei *An. stephensi* darstellen (vgl. Abb. 6, 7). Bei beiden Mückenarten ist dann der Blutkuchen als graue, lipiddurchsetzte Struktur von der PM zu unterscheiden. Zu Zeiten der fortgeschrittenen Blutverdauung, auf 30- bis 60-Stunden-Präparaten, kann, da dann der Darminhalt auch eine braune Farbe annimmt, die PM nicht mehr unterschieden werden.

Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche mittels der Methylenblauextinktion [PEARSE (24)] bei *Ae. aegypti*. Die PM wird bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 als braune lamellöse Struktur sichtbar; aber auch hier nimmt der Blutkuchenrand dieselbe Farbe an. Die Tatsache, daß die PM nicht blau gefärbt wird, läßt darauf schließen, daß ihre braune Farbe pH-bedingt ist.

Da bis jetzt keine besseren Möglichkeiten zur Darstellung der PM in Schnittpräparaten existieren, gewinnt die Methode von FREYVOGEL & JAQUET (12) der Provozierung von Membranbildungen bei *Ae. aegypti* und *An. stephensi* durch Klistiere mit phy-

siol. NaCl besonders an Bedeutung; erst histochemische Reaktionen an Klistiermembranen können letztlich bestätigen, daß die PM existiert und nicht ein Artefakt ist, entstanden etwa durch zusammenhängende, bereits verdaute Blutrückstände.

Überdies — wir haben bereits in der Einleitung darauf hingewiesen — eignen sich die Klistiermembranen besonders gut als Material zu chemischen Analysen, da Verfälschungen der Resultate durch Bestandteile des Blutkuchens ausgeschlossen sind.

2. Die Sekretionsmechanismen und die Entstehung der PM

Die Beobachtungen über das Auftreten der Kohlenhydrate und Lipide während einer ganzen Blutverdauung führen zu folgenden Vorstellungen über die Sekretionsart und die Entstehung der PM bei beiden Mückenarten:

Aedes aegypti

Die Epithelzellen des Mitteldarms der ungefütterten Mücke werden durch den Bluteintritt gestreckt und sezernieren, stimuliert durch diese mechanische Dehnung, auf typisch apokrine Weise ein Sekret, das innert kürzester Zeit den Mageninhalt lückenlos in einer 2 μ dicken Schicht umgibt. Dies deutet auf eine synchron einsetzende Sekretionstätigkeit aller Epithelzellen. Wie an Parallelschnitten gezeigt werden kann, enthält diese Sekretschicht Kohlenhydrate und Lipide. Die Möglichkeit, daß Lipide für den positiven Ausfall der PAS-Reaktion verantwortlich sind, darf jedoch nicht von vorneherein ausgeschlossen werden. Kontrollschnitte, die vor der Färbung mit Chloroform extrahiert wurden, zeigten nach PAS-Färbung eine positive peritrophische Zone, während Lipide nach dieser Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise liegen sie nach dieser Behandlung in so schwacher Konzentration vor, daß sie mit der Sudanschwarz-B-Färbung nicht mehr erfaßt werden können. Mit den verwendeten Methoden konnten Proteine in der peritrophischen Zone nicht nachgewiesen werden, obwohl solche zu gewissen Zeit zweifellos vorhanden sein müssen.

Aus der vom Analpol gegen den Vorderpol fortschreitenden Veränderung der PAS-positiven Schicht in eine braune, PAS-negative, lamellige Struktur in der peritrophischen Zone muß man folgern, daß die PAS-positive Schicht eine Vorstufe der lamellösen, vollständig ausgebildeten PM darstellt, wie sie nach durchschnittlich 24 Stunden gezeigt werden kann.

Anopheles stephensi

Bei dieser Mückenart kann ein anders gearteter Sekretionsmechanismus beobachtet werden (vgl. Abb. 15, 16, 17). Unmittelbar nach der Blutaufnahme stülpen sich die Epithelzellen fingerförmig in das Darmlumen. An den lumenwärts gerichteten Polen erscheinen Sekrettropfen, welche sich von der Zelloberfläche ablösen. Anschließend bilden sich die ausgestülpten Teile zurück, die Zellen nehmen nun eine flache, gestreckte Form an. Ob eine einzelne Zelle zu mehrmaliger Sekretion innerhalb einer Blutverdauung fähig ist, kann nicht entschieden werden.

Nicht alle Epithelzellen sezernieren gleichzeitig; die Aktivität schreitet vom Anal- gegen den Vorderpol hin fort und kann an Stellen, wo die PM nach zirka 30 Stunden voll ausgebildet ist, nicht mehr beobachtet werden. Unseres Erachtens handelt es sich bei dieser Sekretionsart um eine Variante des merokrinen Typus (10), bei welcher die Epithelzellen und der Stäbchensaum, möglicherweise unter der Einwirkung eines Sekretturgors, ins Lumen ausgestülpt werden. Verschiedene Erklärungen für die im Vergleich mit *Ae. aegypti* langsamer und über eine längere Zeitspanne erfolgende Sekretion sind denkbar. Eine Möglichkeit ist, daß der Sekretturgor jeder Zelle vor dem Sekretionsstoß neu gebildet werden muß, wobei sich diese Aufbautätigkeit langsam, beginnend am Analpol, über das Darmepithel ausbreitet. Eine andere Erklärung wäre, daß die Epithelzellen der ungefütterten *Anopheles*-Mücke im Gegensatz zu *Ae. aegypti* keine oder nur wenige Sekretstoffe enthalten, welche dann anläßlich der Blutaufnahme erst synthetisiert werden, beginnend in den analen Epithelzellen. Diese Interpretation wird durch die Befunde Staeublis (30) gestützt, nach denen ebenfalls angenommen werden kann, daß die Sekretion bei *Ae. aegypti* sehr rasch und gleichzeitig erfolgt, da die «whorls» innerhalb zirka 3 Minuten abgebaut werden, während vergleichbare Strukturen bei *An. stephensi* erst $1^1/_2$ Stunden nach dem Saugakt verschwinden, was auf eine länger andauernde Sekretion schließen läßt.

Diese Annahme könnte auch die Befunde Freyvogels (12) über die unterschiedlich lange Bildungszeit der Klistiermembranen und die um zirka 20 Stunden differierende Dauer der Blutverdauung bei beiden Mückenarten erklären. Das Sekret bei *An. stephensi* enthält ebenfalls Kohlenhydrate und Lipide, wobei eine PAS-positive Vorstufe der PM jedoch frühestens nach 8 Stunden, beginnend am Analpol, in Erscheinung tritt. In der Folge zeigt sich, daß die PAS-positive Vorstufe der PM nie längere, zusammenhängende Lamellen bildet und auch ihre PAS-positive Reaktion nie vollständig verliert.

Die PM der untersuchten Mückenarten entsteht aus einem PAS-positiven Sekret, welches sich bei *Ae. aegypti* durchschnittlich 24 Stunden nach dem Saugakt zu PAS-negativen Lamellen umwandelt, während bei *An. stephensi* zwischen 30 und 36 Stunden im PAS-positiven Material PAS-negative, braune Körner auftreten.

3. Die chemische Natur der PM

Wir sind von der Hypothese ausgegangen, die chemische Natur der Klistiermembranen entspreche derjenigen während einer Blutmahlzeit gebildeten Membran. Die histochemischen Befunde bestätigen diese Annahme jedoch nur teilweise, da auf histologischen Präparaten im Membranmaterial selbst nur Kohlenhydrate nachgewiesen werden können. Die Analyse von Klistiermembranen ergab jedoch neben der Anwesenheit von Kohlenhydraten noch diejenige von Lipiden, wobei es sich um Cholesterin, Lecithine und Cholesterinester handeln dürfte. Eine mögliche Erklärung für die Anwesenheit dieser Fettstoffe könnte aus einem Vergleich mit dem Verdauungszyklus von Säugern gefunden werden, bei welchem diese Stoffe die Verdauungs- und Resorptionsfähigkeit beeinflussen (10). Ebenso besteht die Möglichkeit, daß zwar Lipide im Membranmaterial vorhanden sind, aber von der relativ unspezifischen Sudanschwarz-B-Reaktion nicht erfaßt werden.

In bezug auf die Kohlenhydratkomponente der PM beider Mückenarten bestärken die Resultate des Chitinasetests die Befunde Freyvogels (13) et al. (31, 34), wonach diese sowohl bei *Ae. aegypti* als auch bei *An. stephensi* Chitin enthalte. Unterschiede zwischen den beiden Membranen gehen einerseits aus dem Bild der histologischen Präparate und anderseits aus den Resultaten des Versuchs über das Verhalten der Membran von *An. stephensi* nach Einlegen in ein polares und wenig polares Lösungsmittel hervor. Histologisch zeigt die PM von *An. stephensi,* im Gegensatz zu derjenigen von *Ae. aegypti,* in den seltensten Fällen eine deutlich lamellöse Struktur. Sie setzt sich aus einer Summe kleinster, den Eindruck einer Granulation erweckender Chitinpartikeln zusammen, welche höchstens auf kürzeste Distanz lamelliert, in PAS-positivem Material eingebettet sind. In einem polaren Lösungsmittel, wie Wasser, fallen die Chitinpartikeln auseinander, weil sie anscheinend keine zusammenhängende Struktur bilden. Das PAS-positive Material dürfte in unfixiertem Zustand löslich sein, währenddem es im unpolaren Lösungsmittel Chloroform diese Eigenschaft verliert. Gleichwohl könnten chemische Faktoren, z. B.

divergierendes pH der Mitteldarmabschnitte für die Löslichkeit der Membranen verantwortlich sein.

Die Veränderungen in der peritrophischen Zone im Verlaufe einer Blutverdauung nach der PAS-Färbung wurden schon im vorangehenden Abschnitt diskutiert. Ergänzend kann beigefügt werden, daß die PAS-positive Vorstufe der PM wahrscheinlich aus einzelnen Acetylglukosamin-Molekülen, dem Grundbaustoff des Chitins, besteht, welche durch zunehmende Polymerisation langgestreckte Chitinketten bilden, wobei sie ihre PAS-Positivität verlieren.

Elektronenoptische Untersuchungen von BERTRAM & BIRD (1), welche die PM von *Ae. aegypti* im Rahmen einer Studie über das Semliki Forest Virus bearbeiten, beschreiben ein granulöses Sekretionsmaterial, welches bereits eine halbe Stunde nach dem Saugakt zwischen Blutkuchen und Epithel und zwischen dem Stäbchensaum zu beobachten ist, und welches mit großer Wahrscheinlichkeit eine Vorstufe der PM darstellt. Im Prinzip decken sich diese Befunde mit denen unserer Arbeit. Ihre Vermutung, daß diese Vorstufe der PM zum Teil auch aus Bestandteilen der apicalen Region des Stäbchensaums bestehe, kann aus unseren Untersuchungen nicht abgeleitet werden, da an Kryostatschnitten solch feine Beobachtungen kaum möglich sind.

Bei Betrachtung der bisher vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen der PM kommen wir zum Schluß, daß die Bezeichnung «Membran» für diese Struktur nicht zutreffend ist. Der Begriff der PM wurde von Forschern geprägt, die wie DE BOISSEZON (2, 3) und VON DEHN (6) lichtmikroskopisch untersucht haben. Elektronenoptisch ist jedoch eine Membran aus Einheiten zusammengesetzt, die im allgemeinen aus drei Schichten (Lipid-Protein-Lipid) von 80 bis 120 Å Dicke bestehen. Aus diesem Grunde würden wir eine Bezeichnung «peritrophische Schicht» oder «peritrophische Lamina» zur Bezeichnung der PM für zutreffender halten.

4. Der Ablauf der Blutverdauung

Das Auftreten der Kohlenhydrate und Lipide bzw. der Verdauungszustand des Darminhalts während der Dauer einer ganzen Blutverdauung wurde auf den Abbildungen 20a, b und c graphisch dargestellt. Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach dem Saugakt aufgetragen, auf der Ordinate die relative Quantität der im Epithel vorhandenen Kohlenhydrate und Lipide bzw. bei der Darstellung der Abbauvorgänge im Darm die relative Menge

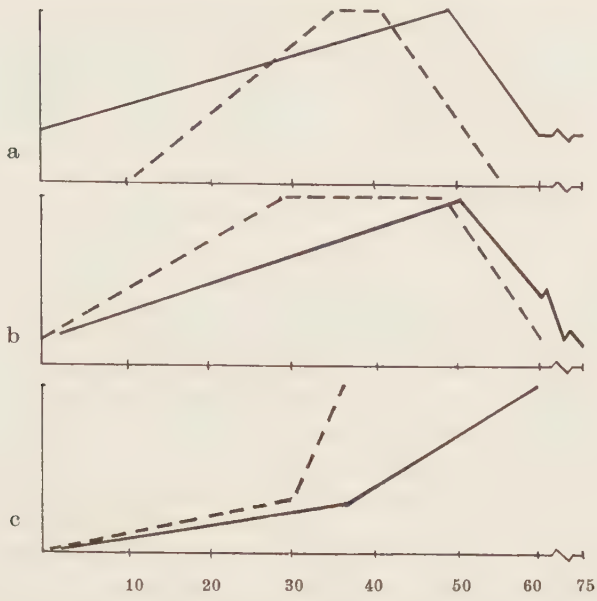


Abb. 20. Der Ablauf der Blutverdauung bei *Ae. aegypti* (– – –) und *An. stephensi* (——). *a)* Das Auftreten der Kohlenhydrate in den Epithelzellen. *b)* Das Auftreten der Lipide in den Epithelzellen. *c)* Der Abbau des Blutkuchens.

des bereits der Verdauung unterworfenen Blutes. Die Ordinatenwerte vermitteln nicht quantitative Angaben, da sie ausschließlich die visuelle Beurteilung der mikroskopischen Präparate wiedergeben. Die Werte bewegen sich zwischen Null und einem willkürlich festgesetzten Maximum.

Das Diagramm über den zeitlichen Ablauf der Blutverdauung (Abb. 20 c) läßt zwei Befunde deutlich werden:

1. Die Blutverdauung ist beendet, bei *Ae. aegypti* nach zirka 35 Stunden, bei *An. stephensi* nach durchschnittlich 55 Stunden nach dem Saugakt; zu diesen Zeiten lassen sich weder Proteine im allgemeinen noch Haemoglobin im besonderen in nennenswerter Konzentration im Darmlumen nachweisen.
2. Der eigentliche Verdauungsvorgang, d. h. der nachweisbare Abbau des Haemoglobins zu einem braunen Material, das den Darminhalt gegen Ende der Blutverdauung erfüllt, ist bei *Ae. aegypti* während der ersten 16, bei *An. stephensi* während der ersten 30 Stunden auf ein Minimum beschränkt. Im folgenden nennen wir diese Periode der Blutverdauung Phase I.

Nach dieser stationären Phase erreicht die Blutverdauung bei *Ae. aegypti* nach zirka 30 Stunden, bei *An. stephensi* nach unge-

fähr 50 Stunden ihren Höhepunkt, das Stadium, bei dem annähernd das gesamte Darmlumen von braunen Blutrückständen erfüllt ist. Diese Phase II ist von der ersten deutlich abgrenzbar.

Die Resultate der histochemischen Reaktionen über das Auftreten der Kohlenhydrate und Lipide im Epithel und im Blutkuchen lassen folgende Abläufe hervortreten:

Phase I

Zu Beginn dieser Phase werden, wie in Abschnitt IV, 2 geschildert, Sekrete, welche Kohlenhydrate und Lipide enthalten, ausgeschieden (vgl. Abb. 9, 16, 17). Die bei *Ae. aegypti* beobachteten, untereinander in Verbindung stehenden Kohlenhydrat- und Lipidinselchen im Blutkuchen stehen kaum mit den vom Darmepithel abgesonderten Sekreten in Zusammenhang, sondern stellen entweder die Gerüstsubstanz des Blutes oder abgesonderte Seruminseln dar, welche nach der Koagulation als PAS-positive bzw. Sudanschwarz-B-positive Strukturen in Erscheinung treten. Ähnliche Bildungen können ebenfalls an Kryostatschnitten PAS-gefärbter Blutstropfen beobachtet werden, welche in Gelatinekapseln zur Koagulation gebracht wurden. Bei *An. stephensi,* deren Speicheldrüsen beim Saugakt ein Antikoagulin ausscheiden (5), wird diese Beobachtung nicht gemacht. Bei *Ae. aegypti* können unmittelbar nach dem Saugakt in der peritrophischen Zone an Parallelschnitten eine Kohlenhydrat- und Lipidschicht gezeigt werden. In den Epithelzellen dieser Mücke hingegen lassen sich vor und bis 10 Stunden nach dem Saugakt keine Kohlenhydrate nachweisen, während solche bei *An. stephensi* mit der PAS-Reaktion gezeigt werden können.

Zusammen mit den Kohlenhydraten und den Lipiden werden sicher auch Enzyme in dieser ersten Phase ausgeschieden, wie Untersuchungen von Fisk & Shambaugh (9) und Gooding (17) über Proteaseaktivität bei *Ae. aegypti* bestätigen. Die Resultate des Benzidintests ergeben, daß proteolytische Fermente in Phase I nur schwach wirksam sind, da die Erythrozyten nur in den Randzonen des Blutkuchens Zeichen von Andauungserscheinungen erkennen lassen. Die langsame Zunahme der Kohlenhydrat- und Lipidkonzentration, wie sie aus Abbildung 20 und 21 hervorgeht, weist auf eine resorbierende Tätigkeit der Epithelzellen hin, welche nach Weber (33) zwischen einzelnen Sekretionsstößen erfolgen kann.

Sowohl bei *Ae. aegypti* als auch bei *An. stephensi* fällt das Ende von Phase I zeitlich mit der voll ausgebildeten PM zusammen. Von diesem Zeitpunkt an kann keine Sekretionstätigkeit der Epi-

thelzellen mehr gezeigt werden. Dieser Umstand wird bei der Besprechung der Bedeutung der PM ausführlicher diskutiert.

Phase II

Der Beginn dieser Phase ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Lipidinseln in der Masse des Blutkuchens sowie durch eine Anreicherung feinster Lipidtropfen in der gegen das Darmlumen gerichteten Seite der PM (vgl. Abb. 6, 7). Bei *Ae. aegypti* kann das Netzwerk von Kohlenhydratinseln im Darmlumen nicht mehr nachgewiesen werden. Auf den mit Benzidin oder Hg-Bromphenolblau angefärbten Präparaten zeigt sich, daß der eigentliche Abbau des Blutkuchens erst jetzt von der PM aus zentripetal fortschreitend einsetzt. Ebenso erreicht die Kohlenhydrat- und Lipidkonzentration in den Epithelzellen beider Mückenarten und die Resorptionstätigkeit des Darmepithels ihren Höhepunkt. Bei *Ae. aegypti* sind es zuerst die Lipide, die den Maximalwert erreichen, welcher ungefähr von der 30. bis zur 50. Stunde nach dem Saugakt unverändert bleibt. Die Kohlenhydrate erreichen ihre höchste Konzentration erst nach zirka 35 Stunden und behalten sie nur während ungefähr 5 Stunden bei.

Bei *An. stephensi* erreichen zuerst die Kohlenhydrate in den Epithelzellen den höchsten Wert. Dieser bleibt während zirka 15 Stunden, d. h. bis ungefähr 50 Stunden nach dem Saugakt, konstant. Die Lipidkonzentration steigt stetig an, erreicht ihren Höhepunkt nach zirka 50 Stunden und bleibt dann während zirka 10 Stunden konstant.

Der Abtransport der resorbierten Stoffe erfolgt bei beiden Mükkenarten in derselben Reihenfolge: zuerst sinkt die Kohlenhydratkonzentration bei *Ae. aegypti* auf den Nullwert, bei *An. stephensi* auf den ungefähren Wert, der unmittelbar nach dem Saugakt beobachtet wird, ab; danach erst sinkt bei beiden Arten die Lipidkonzentration auf die Werte frisch gefütterter Mücken.

Mit der Benzidinreaktion, welche Haemoglobin und Peroxydasen erfaßt, lassen sich letztere während der ganzen Blutverdauung in den Epithelzellen beider Mücken nachweisen. Während die Peroxydasenkonzentration bei *Ae. aegypti* einen Höhepunkt nach zirka 40 Stunden nach dem Saugakt erreicht, bleibt sie bei *An. stephensi* während der ganzen Blutverdauung konstant. Der Befund, daß auch die peritrophische Zone benzidinpositiv ist, deutet entweder auf die Entstehung einer großen Menge Peroxydasen beim Haemoglobinabbau hin oder auf eine größere Unspezifität des Benzidintestes, als bisher angenommen wurde.

Die Substanzen, welche gegen Ende der Blutverdauung das

Darmlumen erfüllen und zur Ausscheidung gelangen, sind bräunliche Abbauprodukte des Blutes — nach WIGGLESWORTH (35) handelt es sich dabei um Protohaematin —, welche mit Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen in geringer Konzentration durchsetzt sind. Diese Beobachtungen stimmen im wesentlichen mit denen von CLEMENTS (5) veröffentlichten überein.

Ein Vergleich unserer Resultate mit den Befunden von FISK & SHAMBAUGH (9) und GOODING (17) über die Proteaseaktivität in Mitteldärmen gefütterter *Ae. aegypti*-Weibchen kann indirekt durchgeführt werden. Sowohl FISK & SHAMBAUGH (9) als auch GOODING (17) beschreiben ein stetiges Ansteigen der Proteaseaktivität im Darm gefütterter Mücken bis 24 Stunden nach der Blutmahlzeit, wenn die Enzymtätigkeit ein Maximum erreicht.

Anschließend sinkt dieser Wert ebenso gleichmäßig, wie er gestiegen ist gegen Ende der Blutverdauung, nach zirka 48 Stunden, wieder auf den der ungefütterten Mücke ab. Unsere Befunde über eine in zwei Phasen verlaufende Blutverdauung führen zu anderen Schlußfolgerungen über die Proteaseaktivität: während Phase I kann sie nur äußerst schwach sein, da der Blutkuchen nur geringe Verdauungsanzeichen in der Randzone erkennen läßt. Erst gegen Ende dieser Phase und zu Beginn von Phase II setzte sie verstärkt ein, was aus der sprunghaft ansteigenden Menge angedauten Blutes ersichtlich wird.

Diese Diskrepanz könnte mit der Anwesenheit eines Hemmfaktors für Proteasen im aufgenommenen Blut (5, 17) in Zusammenhang stehen. Bei den *in vitro*-Versuchen FISKS & SHAMBAUGHS (9) und GOODINGS (17) würde demnach dieser Hemmfaktor durch die Homogenisierung der Mitteldärme zerstört oder inaktiviert.

Die zeitliche Übereinstimmung im Auftreten der Lipide mit den von STAEUBLI (30) in den Epithelzellen beschriebenen Strukturen «whorls» bei *Ae. aegypti* und «Sekretionsgranulation» bei *An. stephensi* zu Beginn einer Blutverdauung könnten auf funktionelle Zusammenhänge hinweisen. Sowohl die «whorls» und die «Sekretionsgranulation» als auch die Lipide in unseren Untersuchungen können in den Epithelzellen ungefütterter Mücken beobachtet werden. Unmittelbar nach dem Saugakt werden die «whorls» und während zirka 2 Stunden nach der Blutaufnahme die «Sekretionsgranulation» abgebaut; in der Stäbchensaumregion treten Sekrete in Erscheinung. Vor allem die «whorls» und ihr rascher Abbau nach dem Saugakt zu kleineren Strukturen würde man am ehesten mit der Protein- bzw. Enzymsynthese in Zusammenhang bringen.

Ähnlich verhalten sich die Lipide der Epithelzellen: nach der Blutaufnahme sinken sie bei den untersuchten Mückenarten auf

ein Minimum ab. In der peritrophischen Zone von *Ae. aegypti* läßt sich dann eine dünne Lipidschicht nachweisen, während bei *An. stephensi* lipidhaltige Zellfortsätze in das Lumen sichtbar werden. Außer diesen zeitlichen Übereinstimmungen können keine morphologischen Parallelen erkannt werden.

5. Die Bedeutung der PM im Rahmen der Verdauung

Der Zeitpunkt der vollständig ausgebildeten Membran fällt bei beiden Mückenarten zusammen mit dem Aussetzen der sezernierenden Tätigkeit der Epithelzellen, dem sprunghaften Ansteigen der bereits der Verdauung unterworfenen Blutbestandteile (Phase II) und der Resorption. Gleichzeitig mit dem Beginn dieser Phase II der Blutverdauung kann eine Lipidanreicherung an der lumenwärts gerichteten Seite der PM im Blutkuchenrand und in den Epithelzellen beobachtet werden, während im Raum zwischen Epithelzellen und PM, der eigentlichen peritrophischen Zone, nur Kohlenhydrate und Proteine nachweisbar sind. Inwieweit dies auf die mangelnde Empfindlichkeit der Sudanschwarz-B-Methode zurückzuführen ist, bleibt dahingestellt. Anderseits könnte man sich vorstellen, daß die Lipide beim Transport durch die peritrophische Zone und zur Resorption an andere Stoffe gebunden sind und damit für die Sudanschwarz-B-Reaktion nicht zugänglich sind. Es könnte zudem die für eine normale Membran ungewöhnliche Eigenschaft bestehen, daß die PM für gewisse freie Lipide undurchlässig ist, worauf die erhöhte Lipidkonzentration an ihrer gegen das Lumen gerichteten Seite zurückgeführt werden könnte. Eine weitere Möglichkeit könnte darin gesehen werden, daß die selektivpermeable PM als Barriere zwischen den Epithelzellen und dem Darminhalt ein Lumen für die in gelöster Form vorliegenden zu resorbierenden Stoffe schafft. Dadurch kann die zur Resorption zur Verfügung stehende Oberfläche optimal ausgenützt werden, da sie nicht durch direkt dem Epithel aufliegende Nahrungspartikeln reduziert wird.

Die Vermutung von FREYVOGEL (13) der Aufgabe der PM, den Darminhalt vor dem Ausfließen zu bewahren, wird durch Versuche mit Mücken, denen physiol. NaCl-Klistiere verabreicht wurden, nicht gestützt, da nämlich die Mitteldarmabschnitte bei beiden Mückenarten unmittelbar nach der Klistierapplikation aus dem Abdomen herauspräpariert werden konnten, ohne daß ihr wäßriger Inhalt in Richtung des Vorder- oder des Enddarms ausfloß.

Bei folgenden Arthropodenordnungen sind bisher PM-Bildungen beschrieben worden: aus dem Unterstamm der *Chelicerata* bei Arten der Ordnungen: *Xiphosura, Araneae* und *Opiliones*; aus dem Unterstamm der *Tracheata* bei Arten der Ordnungen: *Thysanura, Odonata, Embiodea, Phasmida, Dermaptera, Mantodea, Blattaria, Isoptera, Phthiraptera, Hymenoptera, Coleoptera, Mecoptera, Lepidoptera* und *Diptera.* Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß peritrophische Membranen sowohl bei *Xiphosura* (Chelicerata) als auch bei *Thysanura* (Tracheata) nachgewiesen werden können. Innerhalb ihrer Ordnung stellen beide Formen Typen dar, welche paläotypische Merkmale erkennen lassen. Damit stellt sich die Frage, ob die PM nicht etwa ein prototypisches Merkmal aller Arthropoden darstelle. Sie kann jedoch nicht geklärt werden, solange nicht umfassende vergleichende Untersuchungen über die Bildung und Struktur der PM bei jungen und adulten Arthropoden mit verschiedener Ernährungsweise durchgeführt worden sind, speziell in Anbetracht, daß bei verschiedenen Formen (Ixodides, Aphaniptera) eine PM nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine solche vergleichende Untersuchung sollte mit allen zurzeit zur Verfügung stehenden Methoden durchgeführt werden. In bezug auf die uns speziell interessierenden Culicidenarten würden Elektronenmikroskopie an Klistiermembranen, Enzymhistochemie an ungefütterten Mitteldärmen, Autoradiographie an ganzen mit markiertem Blut gefütterten Mücken und elektronenoptische Untersuchungen, welche Darmepithel, peritrophische Zone, PM und Blutkuchen umfassen, tiefere Einblicke in diese Probleme ermöglichen.

V. Literaturverzeichnis

1. Bertram, D. S. & Bird, R. G. (1961). Studies on mosquitoborne viruses in their vectors. I. The normal fine structure of the midgut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L.) and the functional significance of its modification following a blood meal. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *55,* 404-423
2. Boissezon, P. de (1930). Sur l'histologie et l'histophysiologie de l'intestin de la larve de *Culex pipiens* L. — Arch. Zool. exp. gén. *70,* 281-431
3. Boissezon, P. de (1932). Localisation du glycogène et du fer chez *Culex pipiens.* — C. R. Soc. Biol., Paris *111,* 866-867
4. Christophers, Sir R. (1960). *Aedes aegypti* L., the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. — Cambridge: University Press
5. Clements, A. N. (1963). The physiology of mosquitoes. — Oxford: Pergamon Press
6. Dehn, M. von (1933). Untersuchungen über die Bildung der peritrophischen Membran bei Insekten. — Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. *19,* 79-105

7. Fieser, L. F. & Fieser, M. (1960). Lehrbuch der organischen Chemie. — Weinheim: Verlag Chemie
8. Fisk, F. W. (1950). Studies on proteolytic digestion in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. — Ann. ent. Soc. Amer. *43,* 555-572
9. Fisk, F. W. & Shambaugh, G. F. (1952). Protease activity in adult *Aedes aegypti* mosquitoes as related to feeding. — Ohio J. Sci. *52,* 80-88
10. Frazer. A. C. (1963). (Editor). Biochemical problems of lipids. — Amsterdam: Elsevier Publishing Company
11. Freyvogel, T. A. (1961). Ein Beitrag zu den Problemen um die Blutmahlzeit von Stechmücken. — Acta trop. *18,* 201-251
12. Freyvogel, T. A. & Jaquet, C. (1965). The prerequisites for the formation of a peritrophic membrane in *Culicidae* females. — Acta trop. *22,* 148-154
13. Freyvogel, T. A. & Staeubli, W. (1965). The formation of the peritrophic membrane in *Culicidae.* — Acta trop. *22,* 118-147
14. Gander, R. (1951). Experimentelle und ökologische Untersuchungen über das Schlüpfvermögen der Larven von *Aedes aegypti* L. — Rev. suisse Zool. *58,* 215-278
15. Geigy, R. & Herbig, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. — Basel, Verlag für Recht und Gesellschaft = Acta trop., Suppl. 6
16. Giles, E. T. (1965). The alimentary canal of *Anisolabis littorea* (White) (Dermaptera: Lapiduridae), with special reference to the peritrophic membrane. — Trans. roy. Soc. N. Z. Zoology *6,* 87-101
17. Gooding, H. R. (1966). Physiological aspects of digestion of the blood-meal by *Aedes aegypti* L. and *Culex fatigans* Wiedemann. — J. med. Ent. *3,* 53-60
18. Gray, P. (1954). The Microtomist's Formulary and Guide. — London: Constable and Company, Ltd.
19. Huber, W. (1950). Recherche sur la structure submicroscopique de la membrane péritrophique de l'intestin moyen chez quelques insectes. — Arch. Anat. Histol. Embryol. *33,* 1-20
20. Kiszely, G. & Posalaky, Z. (1964). Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. — Budapest: Akademiai Kiado
21. Mets, R. de & Jeuniaux, Ch. (1962). Sur les substances organiques constituant la membrane péritrophique des insectes. — Arch. int. Physiol. *70,* 93-96
22. Meyer, K. (1945). Mucoids and glycoproteins. — Adv. Protein Chem. *2,* 249-275
23. Nisizawa et al. (1963). Chemical nature of a uronic-acid containing polysaccharide in the PM of the silkworm. — J. Biochem. (Tokyo) *54,* 419-426
24. Pearse, A. G. E. (1961). Histochemistry theoretical and applied. — London: J. & A. Churchill, Ltd.
25. Rieder, H. P. (1966). Eine neue Modifikation der Cu-Folin-Methode zur Bestimmung des Totalproteins im Liquor cerebrospinalis. — Klin. Wschr. *44,* 1036-1040
26. Romeis, B. (1948). Mikroskopische Technik. 15. Auflage. — München: R. Oldenbourg
27. Schuschukow, D. F. (1962). The formation of a peritrophic membrane in *Aedes aegypti* L. (in Russian). — Sci. Proc. High Schools Univ. Biol. Sci. *4,* 25-27
28. Snodgrass, R. E. (1935). Principles of insect morphology. — New York and London: McGraw-Hill Book Co. Inc.
29. Stahl, E. (1962). Dünnschicht-Chromatographie. — Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer Verlag.
30. Staeubli, W., Freyvogel, T. A. & Suter, J. (1966). Structural modification

of the endoplasmatic reticulum of midgut epithelial cells of mosquitoes in relation to blood intake. — J. Microscop. *5,* 189-204
31. Stohler, H. (1957). Analyse des Infektionsverlaufes von *Plasmodium gallinaceum* im Darme von *Aedes aegypti.* — Acta trop. *14,* 302-352
32. Waterhouse, D. F. (1953). The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult *Lepidoptera* and *Diptera.* — Aust. J. Zool. *1,* 299-318
33. Weber, H. (1954). Grundriß der Insektenkunde, 3. Aufl. — Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
34. Wigglesworth, V. B. (1961). The principles of insect physiology. — London: Methuen & Co.
35. Wigglesworth, V. B. (1943). The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. — Proc. roy. Soc., London (B) *131,* 313-339

Résumé

1o La formation et la structure chimique de la membrane péritrophique (MP), ainsi que les phases de la digestion du sang chez *Ae. aegypti* et *An. stephensi* sont observées au moyen de coupes effectuées au cryostat.

2o Des études comparatives entre des coupes au cryostat et des coupes en paraffine ont été faites. Le cryostat permet d'éviter dans une large mesure l'apparition d'artéfacts, puisque aucune fixation ni inclusion ne précède la coupe. Les sections au cryostat, contrairement aux sections en paraffine, ne permettent pas une distinction nette des structures cellulaires. Ceci rend plus difficile l'observation des modifications cytologiques différenciées des cellules épithéliales durant la digestion du sang.

3o Des différences structurelles ont été observées dans les membranes péritrophiques. Chez *Ae. aegypti* la MP a une structure lamellaire, chez *An. stephensi,* elle se compose de petits granules qui sont insérés dans du matériel PAS positif. Cette dernière est hydrosoluble ; une explication possible de ce phénomène est discutée.

4o Les cellules épithéliales des deux espèces de moustiques sécrètent tout d'abord une substance PAS positive. Au cours de la digestion du sang cette colorabilité se perd complètement chez *Ae. aegypti* et partiellement chez *An. stephensi.*

5o Des recherches histochimiques sur la nature de cette sécrétion démontrent la présence de lipides et d'hydrates de carbone. Les lipides sont examinés de manière plus précise à l'aide de la chromatographie sur couche mince. La présence de lipides n'avait pas encore été décrite.

6o Entre *Ae. aegypti* et *An. stephensi,* des différences concernant la durée et le mode de la sécrétion ont été constatées. Chez *Ae. aegypti,* toutes les cellules épithéliales sécrètent simultanément et de manière apocrine. Chez *An. stephensi,* une variation de la sécrétion mérocrine a été observée. La sécrétion dure plusieurs heures et s'étend progressivement du pôle caudal au pôle oral.

7o Chez les deux espèces de moustiques, la digestion du sang se déroule en deux phases. La première phase est caractérisée par une sécrétion intensive, la formation de la MP et par de faibles signes d'un commencement de digestion à la périphérie du caillot. Dans la deuxième phase, la MP est définitivement formée, la digestion du sang et la résorption s'intensifient. Aucune sécrétion des cellules épithéliales n'a pu être constatée au cours de cette deuxième phase. Chez *Ae. aegypti,* la digestion du sang s'étend sur 40 heures, chez *An. stephensi,* elle dure de 50 à 60 heures. Des différences temporelles sont visibles dans le

déroulement de la digestion, ainsi que dans la résorption des hydrates de carbone, des lipides et des protéines.

8° Pour mieux démontrer la MP sur les coupes histologiques, des expériences prévoyant différentes méthodes de coloration ont été faites. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le soudan-noir-B et le bleu de méthylène (pH 3–4).

9° Quant à la fonction de la MP, différentes hypothèses sont proposées et discutées.

Summary

1. In *Ae. aegypti* and *An. stephensi* the formation and chemical structure of the peritrophic membrane (PM) as well as the digestion of blood are observed on frozen sections (cryostat).

2. Comparative investigations have been made between sections by cryostat and sections in paraffin of midguts filled with blood. On the frozen sections the formation of artefacts is highly restricted as no fixation and embedding precedes the cutting. Sections by cryostat show the cell-structure less clearly than sections in paraffin, thus making the observation of delicate cytological alternations within the midgut-cells during the blood digestion more difficult.

3. Structural differences are demonstrated in the peritrophic membrane. The PM of *Ae. aegypti* has a laminar structure, whereas that of *An. stephensi* consists of smallest granules which are embedded in PAS-positive material. The latter membrane is water soluble. A possible explanation of this fact is discussed.

4. The epithelial cells of both species of mosquitoes secrete a PAS-positive preliminary state of the PM. In the course of the blood digestion the PM of *Ae. aegypti* loses its positive reaction on the PAS-dye completely, and that of *An. stephensi* partially.

5. Histochemical investigations of material secreted show the presence of carbohydrates and lipides. The lipides are investigated more exactly by means of thin layer chromatography. The presence of lipides has not been described as yet.

6. Differences with regard to duration and mode of secretion have been observed between *Ae. aegypti* and *An. stephensi*. In *Ae. aegypti* all epithelial cells secrete simultaneously in an apocrine way, while in *An. stephensi* a variation of a merocrine secretion has been observed. Here the secretion takes place for several hours proceeding from the anal pole to the front pole.

7. In both species of mosquitoes blood digestion takes place in two phases. Phase I is characterised by an intense secretion, the formation of the PM, and by feeble signs of the beginning digestion in the peritrophic zone of the blood ingested. In phase II the PM is fully developed. Digestion and resorption increase. No more secretion activity of the epithelial cells can be observed. In *Ae. aegypti* blood digestion lasts for 40 hours in the average, in *An. stephensi* between 50 and 60 hours. Differences in duration can be observed in the course of digestion and resorption of carbohydrates, lipides and proteins.

8. To demonstrate the presence of the PM in histological preparations better, different staining methods have been applied. The best results have been obtained with the Sudanblack-B method and the Methyleneblue staining (pH 3–4).

9. With regard to the still unsolved problem of the function of the peritrophic membrane, several possibilities are discussed.

Curriculum vitae

Als Sohn des Eugen Gander, von Basel, Beamter, und der Elisabeth geborene Schultheiss, wurde ich, Eugen Silvano Gander, am 1. Januar 1941 in Basel geboren.

Während der Jahre 1947 bis 1951 besuchte ich die Primarschule in Basel und anschließend das Realgymnasium, wo ich 1959 die Matura bestand.

Im Frühling desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Basler Universität. Ich belegte Zoologie im Hauptfach, Botanik, Bakteriologie-Hygiene und Chemie als Nebenfächer.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Kurse der folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Dahn, Erlenmeyer, Flückiger, Freyvogel, Geiger-Huber, Geigy, Grob, Handschin, Nüesch, Portmann, Reiff, Schmid, Stingelin, Tomcsik und Zoller.

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung der Herren Professoren Dr. R. Geigy und Dr. T. A. Freyvogel.